

**Versuche zur genetischen Transformation bei
lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliidae)**

**Applikation heterologer DNA und ihr Schicksal
im Rezipienten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Jürgen Vielkind
aus Leihgestern (Hessen)

Gießen 1971
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Versuche zur genetischen Transformation bei
lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliidae)**

**Applikation heterologer DNA und ihr Schicksal
im Rezipienten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Jürgen Vielkind
aus Leihgestern (Hessen)

Gießen 1971

D 26

Dekan:

Prof. Dr. G. Eder

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. F. Anders

II. Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung:

12. Februar 1971



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
I. Überblick über bisherige Experimente zum Problem der Transformation	1
II. Wahl eines Systems für Transformationsversuche und Problemstellung	13
B. MATERIAL UND METHODEN	16
I. Gewinnung von Donor-DNA verschiedener Herkunft	16
a) Tritium-markierte DNA aus Escherichia coli	16
b) Tritium-markierte DNA aus Salmonella typhimurium	17
c) DNA aus Kalbsthymus	17
II. Charakterisierung der Donor-DNA	19
a) Physikalische Charakterisierung	19
b) Chemische Charakterisierung	20
III. Lage der DNA im Sucrosegredienten vor und nach Passieren der Injektionskanüle	21
IV. Gewinnung der Embryonen von lebendgebärenden Zahnkarpfen als Rezipienten	22
a) Aufzucht von trächtigen Weibchen	22
b) Isolierung der Embryonen aus trächtigen Weibchen	23
V. Behandlung der Embryonen mit Donor-DNA	24
a) Kultur der Embryonen in DNA-haltigem Medium	24
b) Injektion von DNA-Lösung in Embryonen	24
VI. Weiterverarbeitung der Embryonen nach Behandlung mit Donor-DNA	26

	Seite
C. ERGEBNISSE	28
I. Ergebnis der Charakterisierung der Donor-DNA	28
a) Physikalische Charakterisierung	28
b) Chemische Charakterisierung	30
II. Versuche zur Behandlung von Embryonen mit Donor-DNA	32
a) Überleben der Embryonen in DNA-haltigem Kultur- medium und nach Injektion	32
b) Versuche zur Aufnahme von DNA aus dem Medium	33
c) Versuche zur Injektion von DNA-Lösung	34
III. Versuche über das Schicksal der in den Dotter von Embryonen injizierten H^3 -Donor-DNA	38
a) Verteilung der Radioaktivität in der säureun- löslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen samt Dotter	39
b) Verteilung der Radioaktivität in der säureun- löslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen ohne Dotter sowie des abgetrennten Dotters	40
c) Verteilung der Radioaktivität in der säureun- löslichen und säurelöslichen Fraktion der Zell- kerne sowie des Plasma-Dotter-Materials der Embryonen	42
IV. Versuche zur Identifizierung der Substanzen, an die die Radioaktivität in der säureunlöslichen und säure- löslichen Fraktion der Embryonen gebunden ist	45
D. DISKUSSION	51
E. ZUSAMMENFASSUNG	61
LITERATUR	62
ANHANG	75
Abkürzungen	
Kulturmedien	
Tabellen I bis V	
Abbildungen 1 bis 9	

A. EINLEITUNG

I. Überblick über bisherige Experimente zum Problem der Transformation

Transformation bei Bakterien. In den zwanziger Jahren dieses Jahrhunderts beschäftigte sich GRIFFITH (1928) mit dem Problem der Immunität gegenüber Pneumococcen-Infektionen. Er hatte beobachtet, daß Mäuse, die mit kapselproduzierenden Pneumococcen (S-Pneumococcen, S: smooth=glatt) infiziert worden waren, nach zwei Tagen starben, während Mäuse, die mit nicht-kapselbildenden Mutanten (R-Pneumococcen, R: rough=rauh) infiziert worden waren, überlebten. In der Absicht, die Mäuse gegenüber den S-Pneumococcen zu immunisieren, injizierte er den Mäusen hitzegetötete virulente S-Pneumococcen zusammen mit wenigen lebenden avirulenten R-Pneumococcen. Eine starke Infektion der Mäuse war die Folge; es hatten sich zahlreiche kapselbildende Pneumococcen gebildet, die vom gleichen serologischen Typ wie die S-Pneumococcen waren.

Diesen Vorgang, bei dem avirulente, nicht-kapselbildende R-Pneumococcen in virulente, kapselbildende S-Pneumococcen umgewandelt worden waren, bezeichnete GRIFFITH als Transformation. Von den hitzegetöteten S-Pneumococcen, dem Donor, mußte ein spezifisches Agens auf die R-Pneumococcen, den Rezipienten, übertragen worden sein. Dieses Agens war hitzeresistent und infektiös, und es verhielt sich wie eine genetische Einheit, da die Rezipienten das errungene Merkmal auf die nächste Generation weiter vererbten.

GRIFFITH glaubte damals, daß die typ-spezifische Kapselsubstanz der S-Pneumococcen, ein Polysaccharid, für die beobachtete Transformation der R-Pneumococcen in S-Pneumococcen verantwortlich sei. Es konnte jedoch bald gezeigt werden, daß dieses Polysaccharid nicht das transformierende Prinzip darstellt. Reines, aus S-Pneumococcen isoliertes kapsuläres Polysaccharid besitzt keine transformierende Aktivität (SIA und DAWSON 1931), während zellfreie Extrakte aus S-Pneumococcen, die nur geringe Verunreinigungen an Polysaccharid enthalten, volle transformierende Aktivität aufweisen (ALLOWAY 1933).

Desoxyribonucleinsäure als genetisches Material. Eine systematische Analyse des transformierenden Prinzips in den folgenden Jahren durch AVERY u. Mitarb. ergab, daß dieses mit Desoxyribonucleinsäure (DNA) identisch ist (AVERY, MacLEOD und McCARTY 1944). Neben der chemischen und physikalischen Analyse sowie serologischen Tests führten sie auch enzymatische Tests durch. Es zeigte sich, daß die biologische Aktivität der serologisch inaktiven Fraktion nach Einwirkung von Desoxyribonuclease (DNase) verschwindet; dagegen haben proteolytische Enzyme sowie Ribonuclease (RNase) nicht diese Wirkung (McCARTY und AVERY 1946). AVERY u. Mitarb. zeigten somit zum erstenmal, daß die DNA die genetische Information beinhaltet und diese auch weitergeben kann.

Zunächst wurden diese Ergebnisse jedoch angezweifelt. Sie fielen in eine Zeit, in der zwar das allgemeine Vorkommen der Nucleinsäuren in lebenden Zellen und die fast ausschließliche Lokalisation der DNA in den Chromosomen schon lange bekannt waren (FEULGEN und ROSSENBECK 1924; CASPERSSON 1939/40; vgl. BRACHET 1947), in der aber niemand eine genaue Vorstellung über die Funktion dieser Substanzen hatte. Da man damals glaubte, daß die DNA ein gleichförmiges Polymer von Tetranucleotid-Einheiten darstellt und daher auch keine Spezifität für die zahlreichen sehr verschiedenen Gene besitzen kann (vgl. CHARGAFF 1950), erschien es unwahrscheinlich, daß die DNA die genetische Information beinhaltet. Aus diesem Grunde vermutete man das genetische Material in den variablen Proteinen und schrieb der DNA die Rolle eines Skelettes zu, in das die Gene (=Proteine) eingelagert sein sollten (CASPERSSON 1936).

So wurde immer wieder die Möglichkeit diskutiert, daß das transformierende Prinzip mit geringen Verunreinigungen der DNA identisch ist, die gegenüber proteolytischen Enzymen resistent sind. Letzte Zweifel an der Stichhaltigkeit der Befunde von AVERY u. Mitarb. wurden durch Experimente beseitigt, die zeigten, daß die transformierende Aktivität mit zunehmendem Reinheitsgrad der DNA steigt (HOTCHKISS 1948, 1952; ZAMENHOF, ALEXANDER und LEIDY 1953). HOTCHKISS (1952) gelang es sogar, eine hochgereinigte DNA herzustellen, die weniger als 0,02 % Eiweiß enthielt, dabei aber volle transformierende Aktivität besaß.

Weitere Beweise für die DNA als transformierendes Prinzip brachten die Experimente von GOODGAL und HERRIOTT (1957) und LERMAN und TOLMACH (1957). Sie zeigten, daß P^{32} -markierte DNA irreversibel in die Rezipienten aufgenommen wird und daß die Menge des inkorporierten radioaktiven Materials direkt proportional der Anzahl der transformierten Bakterienzellen ist. Schließlich zeigte es sich, daß mit Hilfe von DNA auch Eigenschaften wie biochemische Synthesefähigkeiten oder Resistenz gegenüber Antibiotika übertragen werden können (vgl. RAVIN 1961; SCHAEFFER 1964). Später wurden diese Transformationsexperimente, die zunächst auf Pneumococcen beschränkt waren, auch auf andere Bakterien ausgedehnt (WACKER und LASCHET 1960; vgl. auch RAVIN 1961 und SCHAEFFER 1964).

Alle diese Versuche zur Transformation stützen und bestätigen die Annahme, daß DNA das genetische Material ist. Allerdings gibt es hierzu einige Ausnahmen, wie erstmals von GIERER und SCHRAMM (1956) an Hand des Tabakmosaikvirus gezeigt wurde; einige pflanzliche und tierische Viren sowie einige Bakteriophagen besitzen als genetisches Material Ribonucleinsäure (RNA) anstelle von DNA (vgl. LURIA und DARNELL 1968).

Natürliche Transformation bei Bakterien. Bei Versuchen zur Transformation bei Micrococcus, Pseudomonas und Neisseria (SMITHIES und GIBBONS 1955; CATLIN 1956; TAKAHASHI und GIBBONS 1957) wurde wiederholt beobachtet, daß in den Kulturen dieser Bakterien eine viskose, schleimige Masse auftritt. Die Analyse dieses "Schleimes" ergab, daß dieser hauptsächlich aus DNA besteht, die von lebenden Bakterienzellen abgeschieden oder aus abgestorbenen Bakterienzellen freigesetzt worden sein kann. Die Vermutung, daß diese extrazelluläre DNA transformierende Aktivität besitzt und daß daher eine natürliche Transformation in den Kulturen stattfinden kann, wurde durch Experimente von CATLIN (1960 a und b) und OTTOLENGHI und HOTCHKISS (1960) bestätigt. Da eine Transformation zur Rekombination des genetischen Materials führt, könnte der als natürliche Transformation bezeichnete Vorgang - wenn er innerhalb einer Population häufig auftritt - die gleiche Rolle in der Evolution spielen wie alle anderen Rekombinationsmechanismen.

Transformation bei anderen Microorganismen. Außer bei Bakterien wurden Transformationsexperimente bei Microorganismen m.W. nur bei Hefen und Blaualgen durchgeführt. Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gelang es, Fähigkeiten zur Vergärung verschiedener Zucker zu übertragen (OPPENORTH 1961); bei der Blaualge *Anacystis nidulans* konnten bestimmte Resistenzmerkmale übertragen werden (SHESTAKOV und KHYEN 1970).

Transformation bei Viren. Transformation bei Viren konnte KAISER (1962) nachweisen. Er infizierte Bakterienzellen mit intakten λ -Phagen und reiner λ -DNA, wobei die DNA der intakten Phagen und die reine DNA Gene für verschiedene Merkmale trugen. In der Phagen-Nachkommenschaft traten daraufhin Merkmalskombinationen auf, die nur durch eine Rekombination zwischen der DNA der intakten Phagen und der zugesetzten reinen Phagen-DNA erklärt werden können.

Ebenfalls als Transformationsereignis wurde lange Zeit das sog. BERRY-DEDRICK-Phänomen interpretiert, bei dem nach Injektion von hitzeinaktivierten Myxomaviren zusammen mit intakten Fibromaviren in Kaninchen eine typische Myxomainfektion zu beobachten ist (BERRY und DEDRICK 1936). JOKLIK u. Mitarb. konnten jedoch zeigen, daß dieses Ergebnis nicht auf einer Rekombination der DNA der beiden verschiedenen Viren beruht, sondern auf einer Helferfunktion des Fibromavirus, das dem Myxomavirus das durch Hitzeinaktivierung zerstörte "uncoating protein" zur Verfügung stellt (JOKLIK, WOODROOFE, HOLMES und FENNER 1960; JOKLIK, HOLMES und BRIGGS 1960; JOKLIK 1966).

Transformation bei höheren Organismen. Die ersten Versuche zur Transformation bei höheren Organismen führten BENOTT, LEROY, VENDRELY und VENDRELY (1957, 1958) durch. Sie konnten phänotypische Merkmale wie Gestalt, Schnabelform und Färbung von Schnabel und Beinen von Khaki-Campbell-Enten mit Hilfe von injizierter Khaki-Campbell-DNA auf Pekin-Enten übertragen. Die transformierten Eigenschaften wurden bis in die dritte Generation verfolgt.

Spätere Versuche derselben Autoren (BENOIT, LEROY, VENDRELY und VENDRELY 1960 a und b) sowie von SVOBODA und HAŠKOVÁ (1959) u.a., in denen dieses Experiment reproduziert werden sollte, scheiterten jedoch. Erfolglos waren auch die Transformationsversuche von BEARN und KIRBY (1959) an Ratten, von ASTAUROV, BEDNIAKOVA, GINSBURG, ZBARSKY und RAMENSKOYA (1960) an Seidenspinnerräupen, von BEATTY und BILLET (1961) an Kaninchen und von BILLET, HAMILTON und NEWTH (1964) am Axolotl.

Auch die Versuche von FAHMY und FAHMY (1961, 1965), bei *Drosophila* bestimmte Merkmale mit Hilfe von Wildtyp-DNA auf Mutanten (bzw. umgekehrt) zu übertragen, waren erfolglos. Zwar beobachteten diese Autoren in der Nachkommenschaft von *Drosophila*-Männchen, in die DNA injiziert worden war, Veränderungen des Phänotyps; jedoch beruhen diese sog. Minute-Phänotypen auf Mutationen (Deletionen), die durch die injizierte DNA induziert worden waren.

Zumindest von den jeweiligen Untersuchern selbst wurden die folgenden Transformationsexperimente an Insekten erfolgreich gewertet. Eine Übertragung verschiedener locus-spezifischer Merkmale fand in Somazellen von Mosaiktieren statt, die YOON und FOX (1965) nach Behandlung der Eier von *Drosophila*-Mutanten mit Wildtyp-DNA erhielten. Entsprechende Ergebnisse erhielten CASPARI und NAWA (1965) hinsichtlich der Flügel-schuppenausfärbung bei *Ephestia*. NAWA und YAMADA (1968) konnten bei *Ephestia* die Wildtyp-Augenfarbe mit Hilfe von Wildtyp-DNA auf entsprechende Mutanten übertragen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser zuletzt genannten Transformationsversuche muß jedoch berücksichtigt werden, daß es sich bei den übertragenen Eigenschaften um Allophäne (vgl. HADORN 1955) handelt. Bei einer kritischen Überprüfung der Ergebnisse sind daher andere Interpretationen als die der erfolgreichen Transformation nicht ausgeschlossen. So könnte die zugesetzte Donor-DNA auch in geringen Mengen Faktoren enthalten haben, die bestimmte Steuermechanismen bei der Ausbildung eines Allophäns beeinflussen.

Neben den Schwierigkeiten bezüglich der Interpretation der Ergebnisse treten bei Transformationsversuchen an höheren Organismen auch methodische Schwierigkeiten auf, auf die vermutlich die zahlreichen Mißerfolge solcher Experimente zurückzuführen sind. Der Prozentsatz von transformierten Zellen ist bei Bakterien etwa 0,1 bis 1 %; es ist anzunehmen, daß der Prozentsatz bei höheren Organismen eher kleiner als größer ist. Die Untersucher sind daher stets auf eine sehr große Individuenzahl angewiesen, die in den seltensten Fällen zur Verfügung stehen dürfte. Bei Transformationsexperimenten an höheren Organismen muß weiterhin mit Schwierigkeiten bei der DNA-Applikation gerechnet werden. Während bei Bakterien eine große Anzahl von Individuen gleichzeitig mit DNA behandelt werden kann, muß die DNA bei höheren Organismen jedem Individuum einzeln zugeführt werden. Bei pflanzlichen Objekten genügt das Anschneiden von Wurzeln oder Schößlingen und Einstellen in eine DNA-haltige Nährlösung. Dagegen muß die DNA bei tierischen Objekten injiziert werden. Da der Ort der Transformation meist nicht identisch mit der Anschnitt- bzw. Injektionsstelle ist, muß die DNA zunächst mit der Körperflüssigkeit transportiert werden und mehrere Zellen passieren, bevor sie die zu transformierenden Zellen erreicht. Dabei ist sie den DNasen des Pflanzensaftes bzw. des Blutes sowie den DNasen der Zellen ausgesetzt und kann abgebaut und damit inaktiviert werden, so daß schon alleine dadurch die Chancen für eine erfolgreiche Transformation verringert werden.

Transformation bei Zellkulturen höherer Organismen. Die genannten Schwierigkeiten bei den Transformationsversuchen an höheren Organismen können weitgehend umgangen werden, wenn die Versuche nicht am ganzen Organismus, sondern an Zellkulturen durchgeführt werden. Hier können Medien gewählt werden, die die Aktivität von eventuell in das Medium abgegebenen DNasen einschränken. Wie bei Bakterienkulturen hat die von außen zugeführte DNA nur eine einzige Zellmembran zu passieren. Außerdem kann bei Zellkulturen - ebenfalls wie bei Bakterienkulturen - eine große Anzahl von Zellen vermehrt werden, so daß auf geeigneten Selektionsmedien ein einziges Transformationsereignis sichtbar gemacht werden kann.

Die Erfolge einiger Experimente an Zellkulturen dürften auf diese Vorteile zurückzuführen sein. So zeigte KRAUS (1961) mit Hilfe von Zellkulturen, daß die Fähigkeit zur Bildung der normalen β -Kette des Hämoglobins mit DNA aus Knochenmarkszellen gesunder Menschen auf Knochenmarkszellen von Patienten mit Sichelzellanämie übertragen werden kann¹. Ebenfalls an menschlichen Zellkulturen zeigten SZYBALSKA und SZYBALSKI (1962), daß inosinphosphorylase-negative Zellen durch Behandlung mit DNA aus inosinphosphorylase-positiven Zellen zu letzteren transformiert werden können. Bei einem weiteren Marker, Resistenz gegenüber 8-Azahypoxanthin, wurde dagegen keine Transformation beobachtet. FOX, FOX und AYAD (1969) beobachteten nach Behandlung von joddesoxyuridin-sensitiven Lymphomazellen mit DNA aus joddesoxyuridin-resistenten Zellen eine Zunahme von resistenten Zellen in den behandelten Kulturen.

BRADLEY, ROOSA and LAW (1962) gelang es bei menschlichen Zellkulturen, Resistenz gegenüber 8-Azaguanin mit Hilfe von DNA aus resistenten Zellen auf sensitive Zellen zu übertragen. Die erworbene Eigenschaft wurde von den Zellen auf die nachfolgenden Generationen vererbt. Da jedoch eine Behandlung der sensitiven Zellen mit DNA aus sensitiven Zellen den gleichen Effekt hatte, kann das Ergebnis dieses Experimentes nicht als Transformationsereignis gewertet werden.

Ein wenig überzeugendes Transformationsexperiment stellt auch die Arbeit von OTTOLENGHI-NIGHTINGALE (1969) dar. Hier gelang es, Melaninsynthese in Melanocyten von Albino-Mäusen mit Hilfe von DNA aus verschiedenen Geweben pigmentierter Mäuse zu induzieren; nach Abbau der Donor-DNA mit DNase trat keine Melaninsynthese in den behandelten Albino-Melanocyten auf. Ob diese Ergebnisse jedoch tatsächlich auf eine Transformation zurückzuführen sind, bleibt zweifelhaft. Dies gilt vor allem deshalb, weil auch hier - wie bei den Versuchen an Insekten (vgl. S.5 f.) - ein Allophän übertragen wurde. Die eingesetzte DNA war nicht ausreichend gereinigt,

¹Ein entsprechendes Ergebnis konnte aber auch WEISBERGER (1962) durch Behandlung unreifer Erythrocyten mit Ribonucleoproteid erzielen.

so daß sie sowohl Protein als auch RNA in größeren Mengen enthielt, die ebenfalls zu einer Ausbildung des Allophäns geführt haben könnten. Außerdem wurden keine Kontrollexperimente, wie etwa eine Behandlung der Albino-Melanocyten mit DNA aus Albino-Gewebe durchgeführt. So können nämlich sehr verschiedene DNA-Präparate häufig zu den gleichen Ergebnissen führen oder auch umgekehrt DNA gleicher Herkunft zu verschiedenen Ergebnissen (vgl. S. 7 und S. 8).

Wie wichtig ausreichende Kontrollexperimente bei Transformationsversuchen an höheren Organismen sind, zeigt sich auch bei den folgenden Untersuchungen. GLICK und SALIM (1967) erhielten Melaninsynthese in amelanotischen Hamstermelanomzellen, die mit DNA aus melanotischen Melanomzellen behandelt worden waren. DNA aus einem Carcinom desselben Hamsterstammes bewirkte dagegen keine Melaninsynthese in den amelanotischen Melanomzellen. Da beide DNA-Präparate aus Tumoren desselben Hamsterstammes isoliert worden waren und daher dasselbe Geninventar enthalten sollten, muß man in Zweifel ziehen, daß es sich bei der Übertragung der Fähigkeit zur Melaninsynthese um eine Transformation durch DNA handelt. Die Tatsache, daß hier - ebenso wie in den Versuchen von OTTOLENGHI-NIGHTINGALE (1969) - keine Melaninsynthese in den amelanotischen Melanomzellen auftrat, wenn die zugeführte DNA vorher mit DNase behandelt worden war, ist nicht beweiskräftig.

Unspezifische Wirkungen der DNA. Bei einigen Transformationsversuchen bei höheren Organismen zeigte sich, daß DNA sehr unspezifische Wirkungen haben kann (vgl. S. 5 und 7). Es soll daher in diesem Zusammenhang nochmals auf die Arbeit von BILLET, HAMILTON und NEWTH (1964, vgl. S.5) eingegangen werden. Diese Autoren zeigten, daß eine Ausfärbung des weißen Axolotl durch Behandlung mit DNA aus Hoden oder Blut sowohl des pigmentierten als auch des weißen Axolotl erreicht werden kann. Den gleichen Effekt erhielten sie auch durch Behandlung mit denaturierter DNA, mit Nucleoprotein und sogar mit DNA aus Geflügelblut. Für das Ergebnis dieser Versuche war daher weder der Ursprung noch der Reinheitsgrad noch die physikalische Struktur der Donor-DNA von Bedeutung.

Andere unspezifische Wirkungen von DNA sind schon seit langem bekannt. LEUCHTENBERGER, LEUCHTENBERGER und UYEKI (1958) beschrieben cytologische und cytochemische Veränderungen in der Leber von weißen Mäusen, die mit DNA aus einem Mammacarcinom von Agouti-Mäusen injiziert worden waren. FREDERIC und CORIN-FREDERIC (1962) beobachteten zahlreiche Chromosomen- und Karyotyp-Aberrationen in Hühnerfibroblasten, die mit nativ oder mit ultraschallbehandelter Kalbthymus-DNA inkubiert worden waren. Häufig wurde auch eine Wachstumsheftung von Zellen nach Behandlung mit DNA beobachtet, wie z.B. die Hemmung von Mäusefibroblasten durch DNA aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (SMITH und CRESS 1961) oder die Hemmung von Leukämiezellen durch DNA aus Mäusethymus (GLICK und GOLDBERG 1965). Dabei zeigte es sich, daß Basenzusammensetzung, helikale Struktur sowie Größe der DNA-Moleküle wichtige Faktoren für eine solche Hemmwirkung sind (GLICK und GOLDBERG 1966).

Aufnahme von DNA in Zellen höherer Organismen. Auf Grund der Mißerfolge, die positiven Ergebnisse des Experimentes an Khaki-Campbell- und Pekin-Enten von BENOIT u. Mitarb. (1957, 1958) zu reproduzieren, wurde in einigen Laboratorien zunächst untersucht, ob Zellen höherer Organismen grundsätzlich DNA aufnehmen und einbauen können. Diese Frage wurde mit Hilfe von H^3 -, C^{14} - oder P^{32} -markierter DNA zu lösen versucht, die sehr einfach aus Bakterien- oder Zellkulturen herzustellen ist.

Wie schon bei Bakterien (vgl. SCHAEFFER 1964), so zeigte sich auch bei tierischen und pflanzlichen Objekten, daß eine Aufnahme von exogener DNA in die Empfängerzellen grundsätzlich möglich ist und daß der Ursprung der DNA dabei weitgehend bedeutungslos ist (HILL 1962; LEDOUX, GALAND und HUART 1962; SCHIMIZU, SKOYAMA und IWAUCHI 1962; WILCZOK 1962 a und b). Allerdings wurden gelegentlich Unterschiede in der aufgenommenen Menge von Donor-DNA verschiedener Herkunft beobachtet (LEDoux 1965). GARTLER (1959, 1960) zeigte, daß menschliche Zellen in Kultur nur einen geringen Anteil der zugesetzten DNA aufnehmen. Von der aufgenommenen DNA wird ein Teil abgebaut, der Rest eventuell in die Zell-

kerne aufgenommen. Ähnliche Ergebnisse publizierten SIROTNAK und HUTCHISON (1959), BENSCH und KING (1961) sowie BORENFREUND und BENDICH (1961). Ob jedoch die von den Zellkernen aufgenommene DNA unverändert in die Chromosomen integriert wird, bleibt offen.

Die Aufnahme von DNA in Zellen höherer Organismen kann durch Zusatz von basischen Substanzen wie Protamin, Histon, Spermin oder Gelatine zur Donor-DNA beträchtlich gesteigert werden (AMOS 1961; SMULL, MALLETTE und LUDWIG 1961; COCITO, PRINZIE und de SOMER 1962). Die basischen Proteine schützen die DNA vor enzymatischem Abbau; sie werden daher meist auch bei Transformationsexperimenten der Donor-DNA zugesetzt (vgl. SZYBALSKA und SZYBALSKI 1962; CASPARI und NAWA 1965; u.a.).

Integration der Donor-DNA in die Rezipienten-DNA. Eine Transformation mit Hilfe exogener DNA kann vermutlich nur dann stattfinden, wenn die Donor-DNA in das Wirtsgenom eingebaut wird². Ob eine solche Integration der Donor-DNA stattfindet, ist wiederholt geprüft worden.

So konnte KAY (1961) mit Hilfe von Basenanalysen der aus DNA-behandelten Ehrlich-Ascites-Tumorzellen isolierten Kern-DNA sowie der radioaktiv markierten Donor-DNA zeigen, daß ein geringer Teil der Donor-DNA vermutlich unverändert in die Zellkerne des Rezipienten eingebaut wird. Unter Verwendung von schwerer bromuracil-(BU)-markierter Donor-DNA konnten auch ROBINS und TAYLOR (1968) durch Basenanalysen und Dichtegradienten-Zentrifugation eine Aufnahme der Donor-DNA in die Zellkerne des Rezipienten nachweisen. Die aufgenommene Menge betrug in diesem Falle etwa 5 % der Kern-DNA; jedoch waren nur etwa 0,25 % in die Chromosomen integriert worden.

²Kürzlich erschien in Proc.N.A.S. 67, 1608-1615 (1970) ein Artikel von FOX und YOON, in dem die Autoren auf Grund neuerer Arbeiten an Drosophila annehmen, daß eine Transformation auch ohne Integration der Donor-DNA in die lineare Struktur der Chromosomen möglich ist; entsprechend dem "Exosomen"-Modell genügt eine Assoziation der Donor-DNA an die homologen DNA-Abschnitte im Chromosom.

AYAD und FOX (1968) behandelten Lymphomazellen mit H^3 -thymidin- bzw. H^3 -joddesoxyuridin- (H^3 -JUdR)-markierter homologer DNA und zeigten, daß beide DNA-Sorten von den Zellen aufgenommen werden. Eine Analyse der DNA aus Zellen, die mit H^3 -JUdR-markierter DNA behandelt worden waren, im Caesiumchlorid-Dichtegradienten ergab einen intermediären Peak zwischen dem Peak der leichten Rezipienten-DNA und demjenigen der schweren H^3 -JUdR-markierten Donor-DNA. Da als Rezipient eine Mutante verwendet worden war, die nur geringe Mengen Thymidin oder das Basen-analogon Joddesoxyuridin verwerten kann, ist es sehr wahrscheinlich, daß der intermediäre Peak Rezipienten-DNA darstellt, in die H^3 -JUdR-markierte Donor-DNA integriert wurde. Die DNA-Menge des intermediären Peaks betrug 1,5 % der Rezipienten-DNA im leichten Peak. Dies läßt vermuten, daß - wie bereits von ROBINS und TAYLOR (1968) gezeigt - Donor-DNA nur in sehr geringen Mengen integriert wurde. Nach neueren Untersuchungen von FOX, FOX und AYAD (1969) scheint sich diese integrierte Donor-DNA auch zu manifestieren (vgl. S. 7).

In den bisher genannten Arbeiten wurden keine Aussagen über den Mechanismus der Integration der Donor-DNA in die Rezipienten-DNA gemacht. Mit dieser Frage beschäftigten sich die folgenden Arbeiten.

LEDOUX und HUART (1969) behandelten Gerstenkeimlinge mit schweremarkerter Bakterien-DNA und analysierten die DNA aus den behandelten Rezipienten im Caesiumchlorid-Gradienten. Sie fanden ebenfalls einen intermediären Peak zwischen dem Peak der leichten Rezipienten-DNA und demjenigen der schweren Donor-DNA. Nach Ultraschallbehandlung der DNA des intermediären Peaks erhielten sie im Caesiumchlorid-Gradienten einen Peak mit leichter Rezipienten-DNA und einen mit schwerer Donor-DNA, nach Hitzedenaturierung dagegen nur einen einzigen, intermediären Peak. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, daß große intakte Donor-DNA-Moleküle Ende-an-Ende mit der Rezipienten-DNA verknüpft werden. Die Integration der Donor-DNA wäre demnach mit der Integration der λ -Phagen-DNA in das Genom von E. coli (vgl. CAMPBELL 1962) oder aber mit dem "breakage and reunion"-Mechanismus bei der Rekombination von DNA-Molekülen des λ -Phagen (vgl. MESELSON und WEIGLE 1961; KELLENBERGER, ZICHICHI und WEIGLE 1961) zu vergleichen.

Zu einem konträren Ergebnis gelangten HILL und HUPPERT (1970). Sie behandelten Hühnerfibroblasten mit schwere-markierter Maus-DNA und analysierten die aus den behandelten Rezipienten isolierte DNA im Caesiumchlorid-Gradienten. Aus der Lage der verschiedenen DNA-Peaks schlossen die Autoren, daß bei der Integration der Donor-DNA in die Rezipienten-DNA keine Ende-an-Ende-Verknüpfung von Donor- und Rezipienten-DNA, sondern vielmehr ein Einzelstrang-Austausch zwischen Donor- und Rezipienten-DNA-Doppelhelix stattgefunden haben muß. Die nach der Bildung einer Heteroduplex auftretenden Lücken in der DNA werden vermutlich - ähnlich wie beim Repair-Mechanismus - durch Neusynthese an diesen Stellen geschlossen.

Ein solcher Mechanismus wurde bereits von EPHRUSSI-TAYLOR und GRAY (1966) auf Grund von Kreuzungsexperimenten für die Rekombination von Donor- und Rezipienten-DNA bei Pneumococcen vorgeschlagen. Ebenfalls bei Pneumococcen zeigten GURNEY und FOX (1968) mit biochemischen und genetischen Methoden, daß die Donor-DNA in der von EPHRUSSI-TAYLOR und GRAY (1966) vorgeschlagenen Weise integriert wird und sich auch manifestiert.

Im Gegensatz zu diesen Experimenten bei Bakterien stützen sich die Arbeiten von LEDOUX und HUART (1969) und von HILL und HUPPERT (1970) ausschließlich auf biochemische Daten und zeigen nicht, ob der integrierten DNA auch eine Funktion zukommt. Lediglich die Ergebnisse von FOX, FOX und AYAD (1969) scheinen darauf hinzuweisen, daß sich die integrierte DNA auch manifestiert (vgl. S. 11).

II. Wahl eines Systems für Transformationsversuche und Problemstellung

Wie aus dem bisher gesagten hervorgeht, sind - von drei Experimenten an Zellkulturen (KRAUS 1961; SZYBALSKA und SZYBALSKI 1962; FOX, FOX und AYAD 1969) abgesehen - noch keine beweiskräftigen Transformationsexperimente an höheren Organismen gelungen (vgl. S. 5 f.). Es konnte jedoch in vivo (LEDOUX und HUART 1969) und in vitro (HILL und HUPPERT 1970) nachgewiesen werden, daß exogene DNA in die DNA des Rezipienten integriert wird (vgl. S. 11 und 12). Die Menge der integrierten Donor-DNA beträgt jedoch weniger als 1 % der DNA-Menge des Rezipienten-Genoms. Während bei Bakterien nachgewiesen werden konnte, daß der integrierten Donor-DNA auch eine Funktion zukommt, konnte dies bisher bei höheren Organismen nur in vitro bei einem einzigen Objekt wahrscheinlich gemacht werden (vgl. S. 11). In vivo-Versuche zur Klärung dieser Frage wurden m.W. noch nicht durchgeführt.

Wie an anderer Stelle bereits näher ausgeführt (vgl. S. 5 f.), ist die Durchführung von Transformationsexperimenten an höheren Organismen mit gewissen Schwierigkeiten verbunden. Bei der Auswahl eines Systems für Experimente zum Transformationsproblem sollte darauf geachtet werden, daß diese Schwierigkeiten auf ein Minimum eingeschränkt werden können. So sollte z.B. für die Übertragung eines spezifischen Merkmales kein Allophän sondern ein Autophän gewählt werden, dessen Ausbildung der Rezipient uneingeschränkt zuläßt. Dieses Phän sollte außerdem leicht zu identifizieren sein, damit eine erfolgte Transformation gut als solche erkannt werden kann.

Ein geeignetes System, das außerdem von genetischer Seite her gut untersucht ist, glauben wir in dem Macromelanophorengensystem bestimmter lebendgebärender Zahnkarpfen gefunden zu haben. Dieses System und seine Vorteile für Experimente zum Transformationsproblem sollen im folgenden beschrieben werden.

Die lebendgebärenden Zahnkarpfen *Platylocichthys maculatus* GUENTHER aus dem Rio Papaloapan (Mexico) und *Xiphophorus helleri* JORDAN und EVERMANN aus dem Rio Lacatilla (Honduras) besitzen artspezifische Farbmuster, die sich aus Erythrophoren und Melanophoren zusammensetzen (ÖKTAY 1964; BECKER-CARUS 1965). Bezüglich der Melanophoren kann zwischen Micro- und Macromelanophoren unterschieden werden, die sich von gleichen Vorläufern, den Melanoblasten, ableiten. Die Melanoblasten wandern im frühen Embryonalstadium (Stadien 10 bis 13 nach TAVOLGA 1949) aus der Neuralleiste in die verschiedenen Körperregionen aus, wo sie sich später zu Micro- und Macromelanophoren ausdifferenzieren (HUMM und YOUNG 1956). Die Ausbildung von Melanophoren beruht auf bestimmten Genen, von denen *X. helleri* nur solche zur Ausbildung von Micromelanophoren hat, während *P. maculatus* außerdem auch solche zur Ausbildung von Macromelanophoren besitzt.

Da die beiden Arten *P. maculatus* und *X. helleri* untereinander kreuzbar sind, kann man leicht die Wirkung des arteigenen Genoms auf die Macromelanophorengene von *P. maculatus* mit derjenigen des Genoms von *X. helleri* vergleichen. Kreuzt man z.B. *P. maculatus*, der ein bestimmtes Macromelanophorengen trägt, mit *X. helleri*, so kommt es in der F_1 -Generation zur verstärkten Manifestation dieses Macromelanophorengens, d.h. in den F_1 -Bastarden werden mehr Macromelanophoren ausgebildet als im reinen *P. maculatus* (letzte Zusammenfassung siehe ANDERS 1967). Nach Rückkreuzung eines solchen F_1 -Bastardes mit *X. helleri* tritt in der F_2 -Generation eine 1:1 Aufspaltung in der Verteilung des Macromelanophorengens ein. Diejenigen Bastarde, die ein Macromelanophorengen tragen, zeigen jetzt eine nochmalige Verstärkung der Manifestation dieses Gens; die Macromelanophoren vermehren sich nun so stark, daß es zur Bildung von Melanomen kommt. Offensichtlich wirkt sich das Ersetzen von *P. maculatus*-Chromosomen durch *X. helleri*-Chromosomen bei der Bastardierung und Rückkreuzung dereprimierend auf die Ausbildung von Macromelanophoren aus (ANDERS 1967).

Wie schon beschrieben, wandern die Melanoblasten der Embryonen während der Entwicklungsstadien 10 bis 13 aus der Neuralleiste aus. Da sie zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu Micro- oder Macromelanophoren ausdifferenziert sind, könnte hier ein erfolgversprechendes Transformationsexperiment ansetzen. Würde man zu diesem Zeitpunkt den Melanoblasten von *X. helleri* mittels *P. maculatus*-DNA Macromelanophorengene zuführen, so könnten sich die Melanoblasten nach Integration dieser Gene anstelle zu Micromelanophoren nun zu Macromelanophoren ausdifferenzieren. Da das *X. helleri*-Genom einen dereprimierenden Effekt auf die Ausbildung von Macromelanophoren ausübt, können sich hier die durch Transformation entstandenen Macromelanophoren ungehemmt vermehren. Es läge dann eine ähnliche Situation vor wie bei transformierten Bakterien, die sich auf einem Selektionsmedium als Kolonien zu erkennen geben. Dabei ist es für die Erkennung eines solchen Transformationsereignisses von Vorteil, daß die sich stark vermehrenden Zellen auf Grund ihres Melaningehaltes gut zu erkennen sind.

Auf Grund dieser guten Ausgangsposition wurde ein größeres Forschungsprojekt über die Transformation bei lebendgebärenden Zahnkarpfen begonnen, das sich von der Aufnahme exogener DNA in die Fischembryonen über die Integration der Donor-DNA in die Rezipienten-DNA bis hin zur phänotypischen Merkmalsausprägung der integrierten Donor-DNA erstrecken soll.

Die vorliegende Arbeit sollte im Rahmen dieses umfangreichen Transformationsexperimentes die grundlegenden Methodiken erarbeiten und sich im wesentlichen mit der Frage beschäftigen, ob den frühen Embryonalstadien hochmolekulare Donor-DNA für den Einbau in das Genom zur Verfügung gestellt werden kann. Dabei sollte zunächst heterologe Donor-DNA aus Bakterien bzw. Kalbsthymus verwendet werden, weil diese leichter in ausreichenden Mengen zu beschaffen ist als homologe DNA aus Zahnkarpfen und dabei trotzdem der Problemstellung der vorliegenden Arbeit genügt (vgl. S. 9). Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit können dann später die eigentlichen Transformationsexperimente gezielt durchgeführt werden.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Gewinnung von Donor-DNA verschiedener Herkunft

Als Donor-DNA wurde tritium-markierte DNA aus *Escherichia coli* bzw. aus *Salmonella typhimurium* sowie nicht markierte (kalte) DNA aus Kalbsthymus benutzt.

a) Tritium-markierte DNA aus *Escherichia coli*

Für die Markierung der DNA von *E. coli* mit Tritium (H^3) wurden zu 500 ml Citratmedium (s. Anhang), die mit 2 bis 4 ml einer Vorkultur von *E. coli* 15T⁻ angeimpft waren, 500 μ Ci H^3 -methyl-Thymin (Radiochemical Centre, Amersham; spezifische Aktivität 23,4 Ci/mM) und 1 mg Thymin zugesetzt. Die Bakterien wurden etwa 15 Stunden bei 37°C bis zu einer Zellzahl von 2×10^9 Zellen/ml Medium kultiviert und anschliessend 15 Min. bei 8000x g und 4°C in einer Christ Zeta 20 abzentrifugiert. Auf diese Weise wurden im Durchschnitt 2 g Bakterien gewonnen.

Die Isolierung der H^3 -markierten DNA aus *E. coli* erfolgte in Abwandlung der Methode von MARMUR (1961). Etwa 2 g Bakterien wurden zweimal mit 0,9 % NaCl, 0,005 M Äthylendiamintetraessigsäure-di-Natrium (EDTA), pH 8, gewaschen, in 20 ml NaCl-EDTA-Lösung suspendiert und nach Einwiegen von 60 mg Penicillin (Calbiochem) für 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschliessend wurden der Lösung 15 mg Lysozym (Calbiochem) zugesetzt und, nach Einstellen des pH-Wertes der Lösung mit NaOH auf 8,0, diese über Nacht bei Raumtemperatur oder für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterienzellen durch Zugabe von gleichem Volumen 1 % Natriumdodecylsulfat-Lösung und Rühren für 10 Min. bei 60°C lysiert. Die sich nun anschließenden Schritte (Aussalzen der Proteine mit Natriumperchlorat, Enteiweissen der DNA mit Chloroform-iso-Amylalkohol 24:1, Ausfällen der DNA mit iso-Propanol und 95 % Äthanol) befolgen genau die Methode von MARMUR (1961). Dabei wurde ein Pipettieren der DNA-haltigen Lösungen vermieden, um eine Scherung der DNA während der Isolierung weitgehend einzuschränken. Die mit Äthanol gewaschene und in 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat (SSC) gelöste DNA wurde zum Schutz gegen Degradation durch Bakterienbefall mit einem Tropfen Chloroform versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt.

b) Tritium-markierte DNA aus Salmonella typhimurium

Für die Markierung der DNA von Salmonella typhimurium mit Tritium wurden zu 500 ml M9-Medium (s. Anhang), die mit 2 bis 4 ml einer Vorkultur von S. typhimurium T⁻ (Stamm 2209, A. EISENSTARK) angeimpft waren, 500 μ Ci H³-methyl-Thymin (Radiochemical Centre, Amersham; spezifische Aktivität 23,4 Ci/mM) und 1 mg Thymin zugesetzt. Zum besseren Einbau des H³-methyl-Thymins in die DNA der Bakterien (EISENSTARK, persönliche Mitteilung) wurden diesem Medium 10 μ g Desoxyguanosin/ml zugegeben. Die Bakterien wurden wie bereits für E. coli beschrieben kultiviert und abzentrifugiert.

Die Isolierung der H³-markierten DNA aus S. typhimurium erfolgte auch hier im wesentlichen nach der Methode von MARMUR (1961). Etwa 2 g der mit NaCl-EDTA-Lösung zweimal gewaschenen Bakterien wurden in 20 ml NaCl-EDTA-Lösung suspendiert und nach Zugabe von gleichem Volumen 2 % Natriumdodecylsulfat-Lösung für 10 Min. bei 60°C gerührt. Nach Abkühlen auf ca. 40°C und Zugabe von 1 mg Pronase (Calbiochem)/ml wurde die Lösung 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die sich nun anschließenden Schritte folgten der Methode von MARMUR (1961), wobei auch hier ein Pipettieren der DNA-haltigen Lösungen vermieden wurde. Die mit Äthanol gewaschene und in SSC gelöste DNA wurde wie oben beschrieben aufbewahrt (vgl. S.16).

c) DNA aus Kalbsthymus

DNA aus Kalbsthymus wurde im wesentlichen nach der Methode von KAY, SIMMONS und DOUNCE (1952) isoliert. Etwa 5 g frisches Gewebe wurden in 200 ml 0,9% NaCl, 0,01 M EDTA, pH 8, unter Zusatz von einem Tropfen Octanol (Merck) im Sorval Omni-Mixer bei 0-4°C homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 6 Lagen Verbandsgaze filtriert. Unter ständigem Rühren wurde das Filtrat mit festem Natriumdodecylsulfat bis zu einer Endkonzentration von 1% versetzt und anschließend 4 Stunden bei 0-4°C gerührt. Das Lysat wurde nun mit fein pulverisiertem NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M versetzt, 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 1 Stunde bei 10 000 x g und 4°C in einer Christ Zeta 20

zentrifugiert. Die sich daran anschließenden Schritte (Enteiweißung der DNA mit Natriumdodecylsulfat, Fällern mit Äthanol) befolgten genau die Angaben von KAY, SIMMONS und DOUNCE (1952). Die isolierte DNA wurde mehrmals mit Äthanol gewaschen, in SSC gelöst und wie beschrieben aufbewahrt (vgl. S. 16).

II. Charakterisierung der Donor-DNA

a) Physikalische Charakterisierung

Identifizierung der H^3 -Bakterien-DNA im Caesiumchlorid-Dichtegradienten sowie Nachweis ihrer Radioaktivität. Für die Analyse der H^3 -Bakterien-DNA im Caesiumchlorid-Dichtegradienten wurden für jeden Ansatz in 5,8 ml SSC-0,01 M EDTA, pH 7,0, 1,25 g festes Caesiumchlorid ($CsCl$, suprapur, Merck) pro ml Lösung eingewogen; je ein Ansatz enthielt 20 μg H^3 -DNA aus *E. coli* oder 20 μg H^3 -DNA aus *S. typhimurium* oder keine DNA. Je 6,5 ml eines jeden Ansatzes wurden in Zentrifugentuben pipettiert, mit ca. 5,5 ml Siliconöl (Merck) überschichtet und 63 Stunden im Winkelrotor 60 der Christ Omega II bei 33 000 U μ m und 22°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Tuben am Boden mit etwas Leukoplast versehen und mit einer Injektionsnadel vorsichtig angestochen. Je Tube wurden 57 Fraktionen zu je 3 Tropfen in kleine Reagenzgläser aufgefangen.

Von den beiden DNA-haltigen Gradienten wurde jeweils abwechselnd je eine Probe für die UV-Absorptionsmessung und je eine für die Radioaktivitätsmessung benutzt. Für die UV-Absorptionsmessung wurden je 0,7 ml aqua dest. zu den hierfür bestimmten Fraktionen gegeben und diese Lösungen in dickwandigen Küvetten von 1 cm Schichtdicke im Zeiss PMQ II Spektralphotometer bei 260 nm ausgemessen. Für die Radioaktivitätsmessungen wurden je 0,5 ml 0,5 N Perchlorsäure (PCA) zu den einzelnen Fraktionen gegeben und die Lösungen 20 Min. bei 70°C im Wasserbad hydrolysiert. Der dabei auftretende Niederschlag wurde abzentrifugiert, das Hydrolysat in Zählgläschen überführt und nach Zugabe von 1 ml abs. Äthanol und 5 ml Szintillationsflüssigkeit (nach BRAY 1960 unter Auslassung von Methanol) im Packard Tricarb Flüssigkeits-Szintillationszähler ausgemessen.

Der Gradient ohne DNA wurde für die pyknometrische Bestimmung der Dichte der einzelnen Fraktionen benutzt (vgl. SZYBALSKI 1968). Da die $CsCl$ -Lösung auch $NaCl$, Natriumcitrat und EDTA enthielt, wurden die ermittelten Werte jeweils um den Betrag korrigiert, der auf diesen Komponenten beruht.

Bestimmung der spezifischen Aktivität der isolierten H^3 -Bakterien-DNA

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der aus Bakterien isolierten DNA wurden je 10 μg DNA in ein Zählgläschen gegeben und nach Zugabe von je 1 ml 0,5 N PCA 20 Min. bei 70°C im Wasserbad hydrolysiert. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden je 1 ml abs. Äthanol und 5 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Die Proben wurden im Philips Flüssigkeits-Szintillationszähler gegen eine bekannte Menge H^3 -Thymin ausgemessen und die Zerfälle pro Minute (Zpm)/ μg DNA errechnet.

UV-Absorptionsmessung und Bestimmung des molaren Extinktions-

koeffizienten. Die Charakterisierung der DNA verschiedener Herkunft erfolgte zunächst durch UV-Absorptionsmessung bei 250, 260, 280 und 290 nm und Errechnen der Extinktionsquotienten $E_{250 \text{ nm}}/E_{260 \text{ nm}}$, $E_{280 \text{ nm}}/E_{260 \text{ nm}}$ und $E_{290 \text{ nm}}/E_{260 \text{ nm}}$. Nach Bestimmung des Phosphorgehaltes der jeweiligen DNA (vgl. weiter unten) und Ermittlung der Extinktion im UV-Licht bei 260 nm wurde der molare Extinktionskoeffizient der DNA nach der folgenden Formel errechnet (vgl. CHARGAFF und ZAMENHOF 1948):

$$\epsilon(P) = \frac{30,98 \cdot E_{260}}{C \cdot l}$$

E_{260} = Extinktion bei 260 nm
 C = Konzentration Phosphor in g/l
 l = Schichtdicke der Küvette in cm

b) Chemische Charakterisierung

Bestimmung des Phosphor- und des Desoxyribosegehaltes. Eine weitere Charakterisierung der DNA verschiedener Herkunft erfolgte durch die Bestimmung des Phosphorgehaltes nach KING (1932) und des Desoxyribosegehaltes nach BURTON (1956) und anschließender Umrechnung der erhaltenen Werte in % der nach UV-Absorptionsmessung in den einzelnen Lösungen vorhandenen DNA-Menge.

Bestimmung des Gehaltes an RNA- und Eiweißverunreinigungen. Der Grad der Verunreinigung der verschiedenen isolierten DNA mit RNA und Eiweiß wurde durch Bestimmung des Ribosegehaltes nach MEJBAUM (1939) und des Eiweißgehaltes nach LOWRY, ROSEBROUGH, FAIR und RANDALL (1951) und Umrechnung der erhaltenen Werte in RNA- und Eiweißgehalt in % der in der jeweiligen Lösung vorhandenen DNA-Menge ermittelt.

III. Lage der DNA im Sucrosegradienten vor und nach Passieren der Injektionskanüle

Um überprüfen zu können, ob die DNA während des Injizierens infolge von Scherkräften zerbrochen wird, wurden etwa 0,2 ml einer DNA-PBS-Lösung (325 μ g DNA aus *S. typhimurium*/ml PBS) durch eine Injektionskanüle gedrückt. Für die Analyse im Sucrosegradienten wurden von dieser Lösung sowie von einer unbehandelten DNA-Lösung je 50 μ g DNA auf je 5 ml eines linearen 5-20 %igen Sucrosegradienten gegeben. Nach 4-stündigem Lauf bei 40 000 Upm und 4°C im Schwenkbecherrotor 40 der Christ Omega II wurden die Tuben am Boden mit etwas Leukoplast versehen und mit einer Injektionsnadel angestochen. Der Inhalt der Tuben wurde über einen Durchfluß-Monitor LKB Uvichord II (Länge der Küvette 3mm, Volumen 0,1 ml) geschickt. Die Transmissionsänderung der durchfließenden Flüssigkeit wurde von einem Servogor-Schreiber aufgezeichnet.

IV. Gewinnung der Embryonen von lebendgebärenden Zahnkarpfen als Rezipienten

Als Rezipienten für die Donor-DNA dienten Embryonen eines jahrzehntelang ingezüchteten Stammes von *Platyopocilus maculatus* GUENTHER aus dem Rio Papaloapan (Mexico). Dieser Stamm wurde ausgewählt, weil er sich - abweichend von den anderen zur Verfügung stehenden Stämmen - relativ leicht züchten läßt und dabei das ganze Jahr hindurch hinlänglich große Würfe zur Welt bringt.

a) Aufzucht von trächtigen Weibchen

Es wurden 20 50 l-Aquarien mit je etwa 20 adulten Weibchen und 8 adulten Männchen von *P. maculatus* besetzt und die Fische bei 27°C unter standardisierten Bedingungen (vgl. VIELKIND 1968) gehalten. Das erste Auftreten von Neugeborenen zeigt an, daß die Zucht in Gang gekommen ist. Um das Werfen der Weibchen besser kontrollieren zu können, wurden die dem äußeren Anschein nach trächtigen Tiere in 1 l-Einmachgläsern isoliert gehalten; die Anzahl der auf diese Weise isolierten Weibchen betrug stets 70 bis 90. Hatte eines dieser Weibchen geworfen, so wurde es zusammen mit anderen Weibchen, die am gleichen Tage geworfen hatten, für 8 Tage in ein 10 l-Vollglasbecken gesetzt. 7 Tage nach einem Wurf sind die Eier eines Weibchens wieder herangereift und können von dem Sperma der Spermatozeugen, die die Weibchen in besonderen Taschen speichern (van OÖRTH 1928; ZANDER 1961), befruchtet werden. Allerdings erwies sich anfangs eine von Weibchen zu Weibchen wechselnde Anzahl von Eiern als nicht befruchtet. Die Anzahl der befruchteten Eier konnte jedoch beträchtlich gesteigert werden, wenn zu je 4 bis 8 isolierten Weibchen 2 bis 3 Männchen gesetzt wurden.

b) Isolierung der Embryonen aus trächtigen Weibchen

8 Tage nach dem letzten Wurf wurde den isolierten Weibchen, nachdem sie mit einer Schere dekapitiert und kurz mit 80 % Äthanol abgewischt worden waren, zur Entnahme der Embryonen die Leibeshöhle geöffnet. Nach Entfernen der Eingeweide wurde das Ovar samt Embryonen mit einer sterilen Pinzette entnommen und in eine kleine Petrischale mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, s. Anhang) mit Penicillin (Calbiochem, 100 000 I.E./10 ml) und Streptomycin (Bayer, 100 000 I.E./10 ml) überführt. Nach kurzem Abspülen in dieser Lösung wurden die Embryonen und Eier in einer zweiten Schale mit steriler penicillin- und streptomycinhaltiger PBS voneinander getrennt (reife Eier kurz vor oder nach der Befruchtung messen etwa 1,6 mm im Durchmesser; Embryonen in frühen Entwicklungsstadien, wie sie für die folgenden Versuche benutzt wurden, messen etwa 2 mm im Durchmesser). Je ein Embryo wurde in ein Reagenzglas mit 1 ml steriler penicillin- und streptomycinhaltiger PBS gesetzt und im Brutschrank bei 27°C bis zur Verarbeitung kultiviert.

Nach 24 Stunden wurde das Entwicklungsstadium der einzelnen Embryonen entsprechend den Angaben von TAVOLGA (1949) bestimmt. Für die meisten Versuche wurden Embryonen der Stadien 9 bis 12 ausgewählt, weil in diesen Stadien die Melanoblasten gerade erst beginnen, aus der Neuralleiste auszuwandern (vgl. S. 15). Nur für einen Versuch (vgl. S. 37) wurden auch Embryonen der Stadien 7 bis 16 verwendet. Die für die hier beschriebenen Experimente nicht benutzten jüngeren bzw. älteren Embryonen wurden für Versuche zur Aufzucht von isolierten Embryonen bis zum schlüpfreifen Stadium und darüber hinaus verwendet; dabei dienten die von HUMM und YOUNG (1956) angegebenen Methoden als Richtlinien (hierüber soll an anderer Stelle berichtet werden, E. von GROTHUSS, Diplomarbeit).

V. Behandlung der Embryonen mit Donor-DNA

a) Kultur der Embryonen in DNA-haltigem Medium

Ein Teil der Versuche beschränkte sich auf die Kultur von Embryonen in DNA-haltigem Medium. Zu diesem Zwecke wurde einen Tag nach der Isolierung der Embryonen (vgl. S. 23) je ein Embryo mit Hilfe einer Platinschlinge in ein Reagenzglas mit 1 ml steriler DNA-haltiger PBS (50 μ g Kalbsthymus-DNA bzw. H^3 -DNA aus E. coli /ml PBS) umgesetzt. Diese Lösung enthielt weder Penicillin noch Streptomycin. Um einem Abbau der DNA durch DNasen entgegenzuwirken (vgl. S.10), wurde die Lösung mit 0,1 μ g Spermin . 4HCl (Serva)/ μ g DNA (CASPARI, persönliche Mitteilung; vgl. auch SZYBALSKA und SZYBALSKI 1962) versetzt. Die Embryonen wurden in dem DNA-haltigen Medium für verschiedene Zeiten inkubiert und anschließend weiterverarbeitet (vgl. S.26).

b) Injektion von DNA-Lösung in Embryonen

Für die meisten Versuche wurden die einzelnen Embryonen einen Tag nach der Isolierung mit steriler DNA-PBS-Lösung injiziert. Die Konzentration der DNA in dieser Lösung betrug stets 325 μ g/ml PBS. Auch diese Lösung war mit 0,1 μ g Spermin . 4HCl / μ g DNA versetzt und enthielt weder Penicillin noch Streptomycin. Um kontrollieren zu können, ob die DNA-Lösung bei der Injektion durch die Kanüle in den Embryo gelangte, wurden der Lösung 20 μ g Phenolrot/ml zugesetzt.

Die Injektion der Embryonen mit DNA-Lösung erfolgte mit Hilfe eines Leitz Micromanipulators. Hierfür wurde der Metallhalter für die Injektionskanüle aus Glas zunächst mit Äthanol sterilisiert und dann mit DNA-Lösung gefüllt. Nach Einschrauben der Kanüle in den Metallhalter wurde dieser an ein Steinhart Micrometer-Dosiergerät angeschlossen, das mit Paraffinöl gefüllt war. Zum Injizieren wurde jeweils ein Embryo in einen passenden Glaslöffel, der in sterile PBS getaucht war, gelegt. In diesen Löffel konnte der Embryo während der Injektion hineingedrückt werden, ohne daß dabei eine Schädigung des Embryo auftrat.

Da die DNA-Lösung auf Grund ihrer hohen Viskosität nur langsam durch die sehr enge Öffnung der Injektionskanüle (Durchmesser etwa 20 μm) ausfließt, wurde während der Injektion die Micrometerschraube des Dosiergerätes nur langsam, nämlich innerhalb einer halben Minute, um ein Volumen von 6 μl verstellt und die Kanüle noch für eine weitere halbe Minute im Embryo belassen. Wie Radioaktivitätsmessungen von Embryonen, in die H^3 -DNA injiziert worden war, ergaben, wurde unter diesen Bedingungen eine tatsächliche Menge von durchschnittlich 0,3 μl DNA-Lösung bzw. 0,1 μg DNA pro Embryo injiziert.

Nach der Injektion wurden die Embryonen zweimal kurz in steriler, penicillin- und streptomycinhaltiger PBS gewaschen. Je ein Embryo wurde in einem Reagenzglas mit 1 ml dieser Lösung für verschiedene Zeiten kultiviert und anschließend weiterverarbeitet (vgl. S.26).

VI. Weiterverarbeitung der Embryonen nach Behandlung mit Donor-DNA

Nach verschieden langer Kultur der Embryonen in DNA-haltigem Medium bzw. nach verschieden langer Kultur der Embryonen, in die DNA injiziert worden war, in PBS wurden die Embryonen zweimal kurz in PBS gewaschen und anschließend aufgearbeitet. Da für die jeweiligen Versuche unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden notwendig waren, sollen diese Methoden in ihren Einzelheiten im Ergebnisteil bei der Desprechung des jeweiligen Versuches dargestellt werden.

Für die Ausmessung der Radioaktivität in den einzelnen Proben wurden diese wie folgt weiterbehandelt. Ganze Embryonen bzw. die säur unlöslichen Fraktionen der Embryonen (Sedimente) wurden zunächst mit Digestin (Merck) behandelt (vgl. SCHAUMLÖFFEL und GRAUL 1967). Die kurz in PBS gewaschenen ganzen Embryonen wurden hierfür einzeln in Zählgläsern gegeben, mit 0,5 ml Digestin und 0,1 ml aqua dest. versetzt und 2 Stunden bei 60°C im Wasserbad geschüttelt; nach dieser Zeit waren die Embryonen vollkommen verflüssigt. Zu den noch heißen Proben wurde je 1 ml abs. Äthanol hinzugefügt. Die verschiedenen Sedimente von 3 oder 4 Embryonen wurden in den Zentrifugentuben mit je 0,5 ml Digestin und 0,1 ml aqua dest. versetzt und 1 Stunde bei 60°C im Wasserbad geschüttelt. Um eine schnellere und ausreichende Auflösung der Sedimente zu erreichen, wurden die Proben alle 15 Minuten zusätzlich mit einem Whirlmix kurz aufgeschüttelt. Die noch heißen Lösungen wurden dann in Zählgläsern abgekippt, die Zentrifugentuben mit je 1 ml abs. Äthanol ausgespült und diese Flüssigkeit zu der Digestinlösung in den Zählgläsern gegeben. Zu den mit Digestin verflüssigten und mit abs. Äthanol versetzten Proben wurden je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (vgl. S. 19) zugesetzt. Zu je 0,1 ml des jeweiligen Kulturmediums der Embryonen, in die H^3 -DNA injiziert worden war, wurden je 1 ml abs. Äthanol und 5 ml Szintillationsflüssigkeit, zu den säurelöslichen Fraktionen der Embryonen (TCA-Überständen) je 1 ml abs. Äthanol und 10 ml Szintillationsflüssigkeit zugesetzt. Anschließend wurden sämtliche Proben im Flüssigkeits-Szintillationszähler ausgemessen.

Für die Ausmessung und quantitative Auswertung der Radioaktivität in den einzelnen Proben wurde ein Philips PW 4510 Flüssigkeits-Szintillationszähler benutzt, da dieses Gerät mit einem Computer ausgerüstet ist, der mit Hilfe von Quenchkorrekturfaktoren eine quantitative Auswertung der Meßdaten vornehmen kann. Die hierfür notwendigen Korrekturfaktoren wurden durch Auswertung von Parallelproben mit bekannter Menge an Radioaktivität ermittelt. Wenn keine quantitative Auswertung der Radioaktivität in den einzelnen Proben notwendig war, wurde ein Packard Tricarb Flüssigkeits-Szintillationszähler benutzt.

C. ERGEBNISSE

I. Ergebnis der Charakterisierung der Donor-DNA

Für einen Teil der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde DNA aus Kalbsthymus benutzt, da Kalbsthymus leicht zu beschaffen ist und bei diesem Gewebe eine sehr hohe Ausbeute an DNA erzielt werden kann. Um das Schicksal der DNA nach Injektion in die Embryonen verfolgen zu können, wurde jedoch für die meisten Versuche radioaktiv markierte DNA benötigt. Hierfür wurde H^3 -DNA aus Bakterien isoliert, da man hier bei Verwendung von Thymin-Mangelmutanten leicht eine starke Markierung der DNA erreichen kann. Außerdem sind die Methoden zur Isolierung von DNA aus Bakterien gut ausgearbeitet, so daß eine hohe Ausbeute an radioaktiv markierter DNA gesichert ist.

Voraussetzung für die Interpretation von Versuchen zum Transformationsproblem ist eine genaue Charakterisierung der eingesetzten Donor-DNA. Das Ergebnis der in dieser Arbeit vorgenommenen Charakterisierung der isolierten und bei den einzelnen Versuchen eingesetzten DNA ist in Abb. 1 a und b sowie in Tabelle I dargestellt. In Tabelle I sind außerdem die theoretischen, auf reine DNA bezogenen Werte für die jeweiligen Kriterien aufgeführt.

a) Physikalische Charakterisierung

CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Identifizierung der aus E. coli (Abb. 1 a) und aus S. typhimurium isolierten Substanz (Abb. 1 b) als radioaktiv markierte DNA wurde mit Hilfe der CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Bei der Auswertung der einzelnen Fraktionen der Gradienten ergaben sowohl die UV-Absorptionsmessung als auch die Radioaktivitätsmessung jeweils einen scharfen Peak im Dichtebereich von 1,710 g/ml. Der theoretische Wert für die Dichte von DNA aus E. coli im CsCl-Gradienten ist 1,710 g/ml und derjenige von DNA aus S. typhimurium 1,712 g/ml (vgl. SCHILDKRAUT, MARMUR und DOTY 1962).

Damit wurde gezeigt, daß die aus *E. coli* und aus *S. typhimurium* isolierte Substanz DNA ist und daß diese radioaktiv markiert ist. Da weder die unteren noch die oberen Fraktionen der Gradienten UV-Absorption oder Radioaktivität aufweisen, enthält diese DNA keine im UV-Licht meßbaren Mengen an RNA-bzw. Eiweißverunreinigungen noch sind eventuell vorhandene geringe, aber im UV-Licht nicht mehr meßbare Mengen an RNA oder Eiweiß radioaktiv markiert. Die aus *E. coli* bzw. aus *S. typhimurium* isolierte DNA stellt daher sehr reine, radioaktiv markierte DNA dar.-Die Identifizierung der aus Kalbsbthymus isolierten Substanz als DNA erfolgte lediglich über die Bestimmung der Extinktionsquotienten im UV-Licht, die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten sowie des Phosphor- und Desoxyribosegehaltes (vgl. 29 f.).

Spezifische Aktivität. Die spezifische Aktivität der H^3 -DNA aus *E. coli* beträgt 2×10^4 Zpm/ μ g DNA, diejenige der H^3 -DNA aus *S. typhimurium* 5×10^4 Zpm/ μ g DNA (Tabelle I, erste Spalte). Die höhere spezifische Aktivität der H^3 -DNA aus *S. typhimurium* ist einmal auf den benutzten Stamm von *S. typhimurium* zurückzuführen, der H^3 -Thymin besonders gut einbaut (EISENSTARK, persönliche Mitteilung), zum anderen darauf, daß die Einbaurrate von H^3 -Thymin durch Zusatz von Desoxyguanosin zum Kulturmedium beträchtlich gesteigert werden kann (vgl. S. 17).

Absorption im UV-Licht und molarer Extinktionskoeffizient. Eine weitere physikalische Charakterisierung der isolierten DNA erfolgte durch Bestimmung der Extinktionsquotienten im UV-Licht und des molaren Extinktionskoeffizienten. Die ermittelten Werte für die Extinktionsquotienten der aus *E. coli* und aus *S. typhimurium* isolierten H^3 -DNA stimmen gut mit den theoretischen Werten hierfür überein (Tabelle I, Spalte 2). Etwas weniger gut stimmen die entsprechenden Werte der Kalbsbthymus-DNA mit den theoretischen Werten überein (Tabelle I, Spalte 2); dies bedeutet, daß die Kalbsbthymus-DNA geringfügig verunreinigt ist (vgl. S. 30f.). Der molare Extinktionskoeffizient der

jeweiligen DNA (Tabelle I, Spalte 3) bewegt sich innerhalb der in der Literatur angegebenen Grenzen (vgl. BEAVEN, HOLIDAY und JOHNSON 1955).

b) Chemische Charakterisierung

Phosphor- und Desoxyribosegehalt. Eine chemische Charakterisierung der isolierten DNA erfolgte durch Bestimmung des Phosphor- und des Desoxyribosegehaltes. Die ermittelten Werte für den Phosphorgehalt sowie für den Desoxyribosegehalt der aus *E. coli* und aus *S. typhimurium* isolierten H^3 -DNA stimmen sehr gut und diejenigen der Kalbsthymus-DNA noch recht gut mit den theoretischen Werten hierfür überein (Tabelle I, Spalte 4 und 5).

Verunreinigung mit RNA und Eiweiß. Der Grad der Verunreinigung der isolierten DNA mit RNA und Eiweiß wurde durch Bestimmung des Ribosegehaltes bzw. des Eiweißgehaltes ermittelt. Die Bestimmung des Ribosegehaltes ergab eine Verunreinigung der Kalbsthymus-DNA sowie der aus *E. coli* isolierten H^3 -DNA mit 5 % RNA und der aus *S. typhimurium* isolierten H^3 -DNA mit 4 % RNA (Tabelle I, Spalte 6). Die Eiweißbestimmung ergab eine Verunreinigung der aus *E. coli* und aus *S. typhimurium* isolierten H^3 -DNA mit 2 % Eiweiß und der Kalbsthymus-DNA mit 10 % Eiweiß (Tabelle I, Spalte 7).

Der Grad der Verunreinigung der Bakterien-DNA mit RNA und mit Eiweiß ist sehr gering und entspricht demjenigen der bei Transformationsversuchen bei Bakterien eingesetzten Donor-DNA. Die Verunreinigung der Kalbsthymus-DNA mit RNA ist ebenfalls sehr gering; dagegen ist diese DNA verhältnismäßig stark mit Eiweiß verunreinigt, wodurch auch die Abweichung der ermittelten Extinktionsquotienten von den theoretischen Werten bedingt ist (vgl. S.29). Der relativ hohe Eiweißgehalt der

Kalbsthymus-DNA beruht einmal auf der für ihre Isolierung angewandten Methode und zum anderen darauf, daß allgemein bei Eukaryonten eine Enteiweißung der isolierten DNA schwieriger ist als bei Bakterien. Für die mit der Kalbsthymus-DNA durchgeführten Versuche war jedoch der hohe Eiweißgehalt dieser DNA nicht von Bedeutung.

II. Versuche zur Behandlung von Embryonen mit Donor-DNA

a) Überleben der Embryonen in DNA-haltigem Kulturmedium und nach Injektion

Bei einigen Transformationsversuchen - z.B. an *Drosophila* (FAHMY und FAHMY 1961) und an Fibroblastenkulturen (SMITH und CRESS 1961) - hatte es sich gezeigt, daß exogene DNA eine vitalitätsmindernde bzw. wachstumshemmende Wirkung auf den Rezipienten ausüben kann. Es wurde daher zunächst geprüft, ob exogene DNA auf die Embryonen eine ähnliche Wirkung hat.

Wie Vorversuche zur Gewinnung und Aufzucht der Embryonen ergeben hatten, sind abgestorbene Embryonen am häufigsten innerhalb der ersten 24 Stdn. nach der Entnahme der Embryonen aus trächtigen Weibchen, später weniger häufig und ab etwa 70 Stdn. nach der Entnahme nur noch ganz vereinzelt zu beobachten. Man kann daher erwarten, daß eventuelle durch DNA hervorgerufene Schadeffekte sich bei den Embryonen ebenfalls innerhalb eines Zeitraumes von etwa 70 Stdn. am deutlichsten zeigen werden.

Etwa 50 Embryonen wurden aus PBS in Kalbsthymus-DNA-haltige PBS (vgl. S. 24) umgesetzt und darin kultiviert. Als Kontrollen dienten etwa gleichviele Embryonen, die in frische PBS ohne DNA umgesetzt wurden. Weiterhin wurde in etwa 90 Embryonen Kalbsthymus-DNA-haltige PBS (vgl. S.24) und in etwa 90 Embryonen als Kontrollen PBS ohne DNA injiziert. Die Injektion erfolgte jeweils in den Raum um die Herzanlage, in die Dorsalregion oder in den Dotter unterhalb der Herzanlage. Anschließend wurden die Embryonen in PBS weiterkultiviert (vgl. S. 25). Nach 24 und 48 Stdn. langer Kultur der Embryonen in DNA-haltiger PBS bzw. 24 und 48 Stdn. nach der Injektion der DNA in die Embryonen wurde der Prozentsatz der überlebenden Embryonen ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle II zusammengestellt. Wie hieraus hervorgeht, hat weder die dem Medium zugesetzte noch die

injizierte DNA einen merklichen Effekt auf die Überlebensrate der Embryonen. Auch das Injizieren als solches, gleichgültig in welche Region der Embryonen, setzte die Lebensfähigkeit der Embryonen nicht herab. Der Wert von nur 72 % Überlebenden, der 48 Stdn. nach der Injektion von Kalbsthymus-DNA in die Dorsalregion der Embryonen ermittelt wurde, beruht sicherlich nicht auf einem Schadeffekt der DNA, sondern vermutlich darauf, daß ein Teil der Embryonen bei der sehr schwierigen Orientierung für die Injektion in die Dorsalregion verletzt wurde und aus diesem Grunde abstarb.

b) Versuche zur Aufnahme von DNA aus dem Medium

Im folgenden Versuch sollte unter Verwendung von H^3 -DNA aus E.coli geprüft werden, ob DNA von den Embryonen aus dem Medium aufgenommen werden kann. Hierfür wurden 20 Embryonen in H^3 -DNA-haltige PBS (vgl.S.24) und 20 Embryonen als Kontrollen in PBS ohne DNA umgesetzt. Jeweils 10 Embryonen wurden nach 10 und nach 24 Stdn. entnommen, einzeln mit Digestin verflüssigt und im Packard Szintillationszähler ausgemessen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle III dargestellt; angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Sowohl nach 10 Stdn. als auch nach 24 Stdn. ist die Anzahl der Impulse pro Minute (Ipm) in behandelten und unbehandelten Embryonen stets die gleiche. Die in H^3 -DNA-haltigem Medium kultivierten Embryonen haben also während dieser Zeit keine DNA aus dem Medium aufgenommen.

Da die Embryonen von einer Hülle aus Gerüsteiweißen umgeben sind, lag die Vermutung nahe, daß diese Hülle für die DNA-Moleküle eine Barriere darstellt. Es wurde daher versucht, die Hülle mit verschiedenen eiweißspaltenden Enzymen zu verdauen (vgl. SMITHBERG 1966). Hierzu wurden Pronase (Calbiochem), Papain (Merck) und Fibrinolysin (Calbiochem) in verschiedenen Konzentrationen (0,005 bis 0,1 %) benutzt. Mit allen diesen Enzymen war es zwar möglich, die Hülle zu verdauen oder zumindest aufzubrechen, jedoch wurden auch gleichzeitig die Embryonen erheblich geschädigt.

Daraufhin wurde versucht, diese Hülle am Micromanipulator mit Hilfe von feinen Glasnadeln zu entfernen ohne dabei die Embryonen zu beschädigen. Dies gelang wenigstens bei einem Teil der Embryonen. Etwa 20 solcher unverletzten, hüllenlosen Embryonen wurden in H^3 -DNA-haltiger PBS kultiviert. Jeweils 10 Embryonen wurden nach 10 und 24 Stdn. aufgearbeitet und im Packard Szintillationszähler ausgemessen.

Das Ergebnis dieses Versuches ist ebenfalls in Tabelle III dargestellt; auch hier sind die Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der Ipm ist in den hüllenlosen Embryonen nach 10 und 24 Stdn. langer Kultur in H^3 -DNA-haltiger PBS etwas höher als in den Kontrollen (vgl. Spalte 3 mit Spalte 1). Diese geringfügige Erhöhung beruht wahrscheinlich auf einer Adsorption der H^3 -DNA an die äußeren Embryonalhüllen (Amnion und Serosa) und nicht auf einer wirklichen Aufnahme der H^3 -DNA in die Embryonen. Vermutlich bilden diese Embryonalhüllen, die beim Fischembryo ähnlich wie bei Embryonen von Säugern eine Schutzfunktion übernehmen, eine Barriere für die Aufnahme von DNA in die Embryonen. Eine Adsorption von DNA an die Zellmembran wurde von zahlreichen Autoren nach Zugabe von DNA zu Bakterienkulturen (LERMAN und TOLMACH 1957) oder Zellkulturen (SIROTNAK und HUTCHISON 1959) beobachtet (weitere Angaben vgl. SCHAEFFER 1964).

c) Versuche zur Injektion von DNA-Lösung

Nachdem festgestellt worden war, daß DNA von den Embryonen nicht aus dem Medium aufgenommen werden kann, sollte im folgenden untersucht werden, ob DNA nach Injektion in die Embryonen für längere Zeit in diesen verbleibt. Bei der Injektion muß jedoch beachtet werden, daß während des Hindurchdrückens einer DNA-Lösung durch eine enge Injektionskanüle die langen DNA-Moleküle sehr leicht zerbrechen können, so daß das Molekulargewicht der DNA reduziert wird. Für eine erfolgreiche Transformation ist aber zumindest bei Bakterien ein mittleres Mindestmolekulargewicht der Donor-DNA von 5×10^5 erforderlich (LITT,

MARMUR, EPHRUSSI-TAYLOR und DOTY 1958; ROSENBERG, SIROTNAK und CAVALLIERI 1959; NICOLAIEFF und CHEVALLIER 1970); dies dürfte auch für eine Transformation bei höheren Organismen der Fall sein (vgl. LEDOUX 1965). Vor dem Passieren der Injektionskanüle genügt die in den vorliegenden Versuchen eingesetzte Donor-DNA zweifellos diesen Anforderungen, da sie nach standardisierten Methoden zur Gewinnung von hochpolymerer DNA isoliert worden war, wobei ein Pipettieren der DNA-Lösungen, bei dem durch Auftreten von Scherkräften eine Herabsetzung des Molekulargewichtes eintreten kann, vermieden wurde. Das Molekulargewicht der Kalbsthymus-DNA dürfte bei etwa 6×10^6 bis 10×10^6 und dasjenige der Bakterien-DNA bei etwa 8×10^6 bis 12×10^6 liegen (vgl. HARBERS 1964 bzw. MARMUR 1961).

Um zu prüfen, ob die DNA während des Hindurchpressens durch die Injektionskanüle in kleine Stücke zerbrochen wurde, wurde die DNA einer durch die Kanüle gedrückten Lösung sowie einer unbehandelten Lösung im Sucrosegradienten analysiert. Da kleinere DNA-Moleküle innerhalb einer bestimmten Zeit im Sucrosegradienten langsamer wandern als größere, müßte die DNA, die infolge von Scherkräften zerbrochen wurde, weiter oben im Gradienten zu finden sein als die DNA der unbehandelten Lösung. Wie in Abb. 2 a und b am Beispiel der H^3 -DNA aus *S. typhimurium* dargestellt, war während des 4-stündigen Laufes in der Ultrazentrifuge die DNA der behandelten Lösung ebenso weit innerhalb des Sucrosegradienten gewandert wie diejenige der unbehandelten Lösung. Das Hindurchpressen der DNA-Lösung durch die Injektionskanüle hatte demnach keine Verringerung des Molekulargewichtes der DNA zur Folge. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Injektion sehr langsam durchgeführt wurde (vgl. S. 25). Ein gewisses Mindestmolekulargewicht der DNA, das für eine erfolgreiche Transformation benötigt wird, wurde somit bei den vorliegenden Versuchen über das Schicksal von Donor-DNA nach Injektion in die Embryonen nicht unterschritten.

Es wurde bereits gezeigt, daß die DNA in verschiedene Regionen der Embryonen injiziert werden kann, ohne daß dadurch die Überlebensrate der Embryonen beeinträchtigt wird. In den nun folgenden Versuchen sollte geprüft werden, ob die in den Raum um die Herzanlage, in die Dorsalregion oder in den Dotter unterhalb der Herzanlage injizierte DNA im Embryo verbleibt oder nach außen in das Kulturmedium abgegeben wird.

Hierfür wurde bei insgesamt etwa 50 Embryonen H^3 -DNA aus E. coli (vgl. S. 24) in die drei genannten Regionen injiziert. Jeweils 5 Embryonen von jeder Gruppe wurden sofort und jeweils 5 Embryonen pro Gruppe 15 Min. und 120 Min. nach der Injektion einzeln in Zählgläschen gesetzt und mit Digestin verflüssigt. Die verflüssigten Embryonen sowie Proben des jeweiligen Kulturmediums (vgl. S. 26) wurden im Philips Szintillationszähler ausgemessen.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 3 a, b und c dargestellt. Abb. 3 a zeigt, daß alle Embryonen zum Zeitpunkt 0, also unmittelbar nach der Injektion der H^3 -DNA in den Raum um die Herzanlage, in die Dorsalregion oder in den Dotter unterhalb der Herzanlage, etwa gleichviel Radioaktivität enthielten. Dies bedeutet, daß mit Hilfe der angewandten Injektionsmethode stets etwa gleichviel H^3 -DNA in die einzelnen Embryonen injiziert worden war. Der größte Teil der Radioaktivität war nach 15 Min. (Abb. 3 b) und nach 120 Min. (Abb. 3 c) lediglich noch in denjenigen Embryonen, denen die DNA in den Dotter injiziert worden war, vorhanden; nur ein geringer Teil der Radioaktivität war im Kulturmedium zu finden. Dagegen war bei denjenigen Embryonen, denen die DNA in den Raum um die Herzanlage oder in die Dorsalregion injiziert worden war, nach 15 Min. ein beträchtlicher Teil (Abb. 3 b) und nach 120 Min. fast die gesamte Menge der injizierten Radioaktivität (Abb. 3 c) im Kulturmedium zu finden. Die Ursache hierfür liegt vermutlich darin begründet, daß die durch die Injektionskanüle verursachte Wunde bei der Injektion der DNA-Lösung in den Dotter schnell mit Dottermaterial verstopft wird, während die

Wunde bei Injektion in den Raum um die Herzanlage oder in die Dorsal-region offen bleibt und so die injizierte Flüssigkeit relativ schnell nach außen abgegeben wird.

Um zu überprüfen, ob auch nach längeren Zeiten nach der Injektion der H^3 -DNA in den Dotter der Embryonen keine Radioaktivität im Kulturmedium zu finden ist, sollte dieser Versuch auf einen größeren Zeitraum ausgedehnt werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob das jeweilige Stadium der Embryonen zum Zeitpunkt der Injektion einen Einfluß auf das Ergebnis eines solchen Versuches hat. Um auch geringe Spuren von ins Medium abgegebener H^3 -DNA erfassen zu können, wurde in diesem Versuch - wie auch in allen weiteren, sich hieran anschließenden Versuchen - H^3 -DNA aus *S. typhimurium* eingesetzt, da diese eine höhere spezifische Aktivität als diejenige aus *E. coli* aufweist (vgl. S.29 und Tabelle I).

Bei etwa 300 Embryonen der Stadien 7 bis 16 wurde H^3 -DNA aus *S. typhimurium* (vgl. S.24) in den Dotter injiziert und 0, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 70, 95, 120, 150, 170, 200, 240, 280, 310 und 360 Stdn. später je 15 bis 20 Embryonen sowie Proben des jeweiligen Kulturmediums auf Radioaktivität geprüft.

In Abb. 4 sind die Ergebnisse dieses Versuches zum Zeitpunkt 0, 2, 20, 95, 200 und 360 Stdn. nach der Injektion dargestellt. Es zeigte sich, daß nur gelegentlich eine geringe Menge an Radioaktivität in das Kulturmedium abgegeben wurde und daß das Stadium, in dem sich die Embryonen zum Zeitpunkt der Injektion befanden, keinen Einfluß auf das Verbleiben der Radioaktivität im Embryo hatte.

III. Versuche über das Schicksal der in den Dotter von Embryonen injizierten H^3 -Donor-DNA

In dem vorangegangenen Versuch wurde gezeigt, daß H^3 -Bakterien-DNA, die in den Dotter von Embryonen injiziert wurde, - gemessen an der Radioaktivität - über den gesamten geprüften Zeitraum von 360 Stdn. in den Embryonen verbleibt. Die Messung der Radioaktivität im gesamten Embryo läßt jedoch keine Aussage darüber zu, ob die injizierte H^3 -DNA bis zu 360 Stdn. nach der Injektion in unveränderter Form im Embryo vorliegt oder ob ein Abbau dieser DNA stattgefunden hat. Eine Antwort auf diese Frage ergibt sich möglicherweise durch die Trennung von säureunlöslichem und säurelöslichem Material der Embryonen und Messung der Radioaktivität in diesen beiden Fraktionen. Die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion repräsentiert dann relativ hochmolekulare H^3 -DNA, die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion dagegen abgebaute H^3 -DNA.

Die Methode zur Trennung von säureunlöslichem und säurelöslichem radioaktiv markiertem Material erlaubt jedoch nicht zu entscheiden, inwieweit die hochmolekulare H^3 -DNA noch Donor-DNA oder bereits Rezipienten-DNA ist, die durch den Einbau von Abbauprodukten der H^3 -Donor-DNA radioaktiv markiert wurde. Versuche, die eine solche Unterscheidung ermöglichen und außerdem eine Antwort auf die Frage geben können, ob hochmolekulare Donor-DNA von den Embryonen aufgenommen und in deren DNA integriert wird, werden zur Zeit mit Hilfe der CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation von DNA aus Embryonen, in die schweremarkierte H^3 -Donor-DNA injiziert wurde, durchgeführt.

Die nun folgenden Versuche sollen über die Verteilung der Radioaktivität in säureunlöslicher und säurelöslicher Fraktion von

- a) Embryonen samt Dotter,
 - b) Embryonen ohne Dotter sowie abgetrenntem Dotter und
 - c) Zellkernen der Embryonen und zugehörigem Plasma-Dotter-Material
- Auskunft geben. Sie sollen im wesentlichen zeigen, welche Chancen für eine Aufnahme und Integration von hochmolekularer Donor-DNA in die Embryonen bzw. in deren DNA und damit für den Erfolg eines Transformationsexperimentes bestehen.

Bei der Darstellung der Ergebnisse dieser Versuche wurde wie folgt verfahren. Die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen wurde in % der gesamten injizierten H^3 -DNA-Radioaktivität angegeben. Dies war möglich, da nach der Injektion keine oder nur eine sehr geringe Menge an Radioaktivität in das Medium abgegeben wird (vgl. S.37). Diese Art der Darstellung wurde gewählt, um die Ergebnisse der einzelnen Versuche stets unmittelbar miteinander vergleichen zu können.

a) Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen samt Dotter

Für den folgenden Versuch wurde in etwa 230 Embryonen H^3 -DNA injiziert. In der Regel wurden jeweils 3 Parallelproben zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion aufgearbeitet. Für jede Probe wurden 3 oder 4 Embryonen samt Dotter in 0,5 ml eisgekühlter 0,3 M Trichloressigsäure (TCA) in 5 ml fassenden Potter-Homogenisatoren homogenisiert. Das Homogenat wurde in vorgekühlte Zentrifugentuben überführt, der Homogenisator mit 0,5 ml 0,3 M TCA gespült und das Homogenat zusammen mit der Waschflüssigkeit 15 Min. bei 2000 x g und $4^{\circ}C$ zentrifugiert. Der TCA-Überstand wurde in ein Zählgläschen abgekippt, das Sediment mit 0,5 ml 0,3 M TCA gewaschen, zentrifugiert und der Überstand mit dem ersten TCA-Überstand vereinigt. Das Sediment wurde mit je 1 ml Acetatwasser, Acetatwasser-Äthanol 1:3, 95% Äthanol, abs. Äthanol und Äther gewaschen. Die mit Digestin verflüssigten Sedimente (säureunlösliche Fraktion) und die TCA-Überstände (säurelösliche Fraktion der Embryonen) wurden im Philips Szintillationszähler ausgemessen (vgl. S. 26).

Die Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen samt Dotter ist in Abb. 5 dargestellt. Es zeigt sich, daß während der ersten 5 Stdn. nach der Injektion nahezu alle Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen zu finden ist. Während der folgenden 40 Stdn. nimmt die Radioaktivität ab und erreicht bei 45 Stdn. nach der Injektion ein Minimum von ca. 50 % der injizierten Radioaktivität. Anschließend nimmt die Radioakti-

vität in dieser Fraktion wieder zu und erreicht bei 80 Stdn. 75 %. Danach nimmt die Radioaktivität nur noch sehr langsam zu und erreicht schließlich bei 140 Stdn. 85 %. In der säurelöslichen Fraktion der Embryonen verhält sich die Radioaktivität spiegelbildlich hierzu, da sie ja auf die gesamte injizierte Radioaktivität, die als 100 % gesetzt wurde, bezogen wurde.

b) Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen ohne Dotter sowie des abgetrennten Dotters

In dem folgenden Versuch sollten Dotter und eigentlicher Embryo getrennt voneinander untersucht werden. Dies ist möglich, da bei Teleostiern - anders als bei Amphibien - Embryo und Dotter gut voneinander abgesetzt sind und daher leicht voneinander getrennt werden können. Eine Abtrennung des Dotters vom Embryo läßt sich gut durch Anstechen des Dottersackes und Auffangen des ausfließenden Dottermaterials durchführen. Die lichtmikroskopische Untersuchung des abgetrennten Dottermaterials ergab jedoch, daß dieses fast immer erhebliche Mengen an feulgenpositiven, kernähnlichen Strukturen enthält. Da die Embryonen zum Zeitpunkt der Injektion der H^3 -DNA bereits ein nahezu vollständig ausgebildetes Blutgefäßsystem besitzen, das beim Anstechen des Dottersackes verletzt wird, stellen diese Strukturen vermutlich Erythrocyten und deren Vorstufen dar, die aus den Gefäßen des Dottersackes mit in den ausfließenden Dotter gelangen. Der Versuch, durch vorheriges kurzes Fixieren der Embryonen in 6,5 % Glutaraldehyd-PBS zu verhindern, daß diese Strukturen mit in das Dottermaterial gelangen, hatte nicht den gewünschten Erfolg. Die Trennung von Embryonen und Dotter wurde daher weiterhin ohne vorheriges Fixieren der Embryonen durchgeführt. Bei der Interpretation der Ergebnisse des folgenden Versuches ist daher zu berücksichtigen, daß diese Trennung nicht vollständig geschah.

In etwa 250 Embryonen wurde H^3 -DNA injiziert. In der Regel wurden jeweils 3 Parallelproben zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion aufgearbeitet. Für jede Probe wurden 3 oder 4 Embryonen in einen Platinlöffel gelegt, der in 0,3 ml PBS in einem von unten mit Eis gekühlten Porzellanlöffel eingetaucht war. Der Dottersack der Embryonen wurde mit feinen Präpariernadeln angestochen und vorsichtig gequetscht bis das gesamte Dottermaterial in die PBS ausgeflossen war. Die vom Dotter befreiten Embryonen wurden in 0,5 ml eisgekühlter 0,3 M TCA homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 Min. bei 2000 x g und $4^{\circ}C$ zentrifugiert, das Sediment mit 0,5 ml 0,3 M TCA gewaschen und die TCA-Überstände vereinigt. Das in der PBS gesammelte Dottermaterial wurde in vorgekühlte Zentrifugentuben überführt, der Porzellanlöffel mit 0,3 ml PBS nachgespült und die Waschflüssigkeit mit dem Dottermaterial vereinigt. Anschließend wurde das Dottermaterial mit 0,6 ml 0,6 M TCA ausgefällt. Nach 20 Min. Zentrifugation bei 2000 x g und $4^{\circ}C$ wurde das Sediment mit 0,3 ml 0,3 M TCA gewaschen und die TCA-Überstände vereinigt. Sedimente und TCA-Überstände der Embryonen bzw. des Dotters wurden wie auf S. 39 beschrieben weiterverarbeitet.

Die Verteilung der Radioaktivität in säureunlöslicher und säurelöslicher Fraktion der Embryonen ohne Dotter sowie des Dotters zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion ist in Abb. 6 dargestellt. Während der ersten 5 Stdn. ist nahezu alle Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion des Dotters zu finden. Dann nimmt die Radioaktivität in dieser Fraktion ab, erreicht nach 50 Stdn. etwa 40 % und nähert sich langsam 35 % bei 140 Stdn. Während desselben Zeitraumes, in dem die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion des Dotters schnell sinkt, steigt sie in der säurelöslichen Fraktion des Dotters stetig an und erreicht zwischen 40 und 45 Stdn. ein Maximum von etwa 50 %. Zwischen 45 und 75 Stdn. nimmt die Radioaktivität in dieser Fraktion schnell bis auf 30 % ab und nähert sich dann langsam 20 % bei 140 Stdn. Kurz bevor die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion des Dotters ihr Maximum erreicht, also bei etwa 40 Stdn. nach der Injektion, erfolgt ein rascher Anstieg der Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen, die bis dahin weniger als 5 % der

Radioaktivität enthielt. Diesem relativ schnellen Anstieg der Radioaktivität auf 35 % bei 70 Stdn. folgt ein langsamer Anstieg bis zu 50 % bei 140 Stdn. Während des gesamten Zeitraumes von 140 Stdn. sind weniger als 1 %, also keine nennenswerten Mengen an Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion der Embryonen zu finden.

c) Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Zellkerne sowie des Plasma-Dotter-Materials der Embryonen

Um die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen ohne Dotter näher lokalisieren zu können, sollten im folgenden Versuch Zellkerne und das verbleibende Plasma-Dotter-Material der Embryonen getrennt voneinander untersucht werden. Da die in der Literatur angegebenen Methoden zur Isolierung von Zellkernen nur für das jeweilige Versuchsobjekt gelten, waren für die Herstellung einer Kernfraktion aus Embryonen einige Vorversuche notwendig. Ziel dieser Untersuchungen war es, diese Methoden so anzupassen, daß keine Zellkerne zerstört und Kern- und Plasma-Dotter-Material möglichst gut voneinander getrennt wurden. Eine solche Methode sollte außerdem eine schnelle routinemäßige Aufarbeitung ermöglichen, weil Macromoleküle wie DNA in wäßrigen Medien leicht aus den Zellkernen herausgelöst werden (DOUNCE 1963).

Um einer Zerstörung der Kerne während der Isolierung vorzubeugen, wurden Embryonen in einem 5 ml fassenden Potter-Homogenisator stets von Hand bei 0-2°C homogenisiert. Als Homogenisierungsmedien wurden 0,15 M Sucrose mit 2,8 % Citronensäure (DOUNCE 1963), ferner PBS sowie 0,25 M Sucrose-PBS geprüft. Das Homogenat wurde 20 Min. bei 2°C und 600, 800 und 1000 x g zentrifugiert und einmal mit dem entsprechenden Medium gewaschen. Die Überprüfung der Kern- bzw. Plasma-Dotter-Fraktion auf Verunreinigung erfolgte unter dem Mikroskop entweder im Phasenkontrast oder nach Färbung mit Methylenblau im Hellfeld. Es zeigte sich, daß beim Homogenisieren in den verschiedenen Medien die Kerne unzerstört blieben. Bei Verwendung von 0,25 M Sucrose-PBS als Homogenisier-

medium und Zentrifugation bei 800 x g waren sowohl die Kern- als auch die Plasma-Dotter-Fraktion relativ frei von Verunreinigungen.

Nach diesen Vorarbeiten wurde in etwa 200 Embryonen H^3 -DNA injiziert. In der Regel wurden jeweils 3 Parallelproben zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion aufgearbeitet. Für jede Probe wurden 3 oder 4 Embryonen in 0,3 ml eisgekühlter 0,25 M Sucrose-PBS in einem Potter-Homogenisator von Hand homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 Min. bei 800 x g und 2°C zentrifugiert und der Überstand in vorgekühlte Zentrifugentuben gegeben und in Eiswasser aufbewahrt. Das Sediment, die Kernfraktion, wurde in 0,3 ml Sucrose-PBS, mit denen zuvor der Homogenisator gespült worden war, suspendiert und 20 Min. bei 800 x g und 2°C zentrifugiert. Die vereinigten Überstände, die Plasma-Dotter-Fraktion, wurden mit 0,6 ml 0,6 M TCA ausgefällt und zentrifugiert. Das Sediment hiervon wurde mit 0,3 ml 0,3 M TCA gewaschen und die TCA-Überstände vereinigt. Die Kernfraktion wurde in 0,5 ml PBS suspendiert, mit 0,5 ml 0,6 M TCA ausgefällt, zentrifugiert und mit 0,5 ml 0,3 M TCA gewaschen. Sediment und vereinigte TCA-Überstände hiervon sowie des Plasma-Dotter-Materials wurden als säureunlösliche bzw. säurelösliche Fraktion des Kern- bzw. des Plasma-Dotter-Materials wie auf S. 39 beschrieben weiterverarbeitet.

Die Verteilung der Radioaktivität in säureunlöslicher und säurelöslicher Fraktion von Kern- und Plasma-Dotter-Material zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion ist in Abb. 7 dargestellt. In der säureunlöslichen Fraktion des Plasma-Dotter-Materials ist die Radioaktivität während der ersten 15 Stdn. nach der Injektion nahezu konstant; sie beträgt etwa 70 % der injizierten Radioaktivität. Danach nimmt die Radioaktivität in dieser Fraktion relativ schnell ab, erreicht bei 70 Stdn. etwa 15 % und sinkt dann langsam auf etwa 5 % bei 140 Stdn. In der säurelöslichen Fraktion des Plasma-Dotter-Materials steigt die Radioaktivität von Versuchsbeginn an innerhalb von 40 Stdn. kontinuierlich auf etwa 50 % und sinkt dann auf 35 % bei 70 Stdn. und auf 10 % bei 140 Stdn. ab. In der säureunlöslichen Fraktion der Kerne nimmt die Radioaktivität von 30 % zum Zeitpunkt der

Injektion bis auf 10 % bei 20 Stdn. nach der Injektion ab. Danach steigt sie kontinuierlich an und erreicht schließlich bei 140 Stdn. 85 %. In der säurelöslichen Fraktion der Kerne beträgt die Radioaktivität - abgesehen von dem Zeitraum zwischen 30 und 80 Stdn. nach der Injektion, in dem sie etwa 5 % erreicht - weniger als 1 %.

Der Befund, daß die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion der Kerne zum Zeitpunkt 0 bereits 30 % beträgt und dann innerhalb von 20 Stdn. auf 10 % sinkt, erschien zunächst sehr unwahrscheinlich, da kaum anzunehmen ist, daß bereits unmittelbar nach der Injektion mehr H^3 -DNA in die Kerne gelangt war als 20 Stdn. später in diesen zu finden ist. Der erste Abschnitt des Versuches zwischen 0 und 30 Stdn. nach der Injektion wurde daher wiederholt. Es zeigte sich jedoch, daß das oben beschriebene Ergebnis reproduziert werden konnte.

IV. Versuche zur Identifizierung der Substanzen, an die die Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen gebunden ist

Die vorangegangenen Versuche über das Schicksal von H^3 -DNA nach Injektion in den Dotter der Embryonen haben ergeben, daß etwa 40 Stdn. nach der Injektion ein erheblicher Anteil der injizierten Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion des Dotters auftritt; etwa zur gleichen Zeit steigt die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen (vgl. S. 40 ff.). Für die Interpretation der Versuche stellt sich hier die Frage, ob die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion des Dotters an Thymidin als eventuell auftretendem Abbauprodukt der H^3 -DNA und in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen an DNA gebunden ist. Die folgenden Untersuchungen zielen daher darauf ab, die Substanzen, an die die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen gebunden ist, zu identifizieren. Solche Versuche erscheinen besonders deshalb notwendig, weil z.B. bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (HARBERS und HEIDELBERGER 1959) und *Neurospora crassa* (FINK und FINK 1962) hohe Angebote an Thymidin oder anderen Desoxyribosiden zu einem teilweisen Umbau und anschließendem Einbau dieser Substanzen in die RNA der Zellen führen können.

Zur Beantwortung der Frage, an welche Substanz die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion des Dotters gebunden ist, besteht die Möglichkeit, eine Analyse der in dieser Fraktion enthaltenen Basen durchzuführen und zu prüfen, ob die Radioaktivität an Thymin gebunden ist. Eine andere Möglichkeit - von der hier Gebrauch gemacht wurde - ist, die H^3 -DNA zusammen mit kaltem Thymidin im Überschuß zu injizieren und die Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion von Embryonen und Dotter zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion mit derjenigen zu vergleichen, die sich nach Injektion von H^3 -DNA alleine ergab. Falls die injizierte H^3 -DNA durch DNasen abgebaut wird und ihre Abbauprodukte vom Embryo zur Synthese von säureunlöslichem Material verwendet werden, müßte sich die Zugabe von kaltem Thymidin in der Weise auswirken, daß - auf

Grund der Verdünnung des H^3 -Thymidins mit kaltem Thymidin - in der säurelöslichen Fraktion des Dotters nach etwa 40 Stdn. nur eine verzögerte Abnahme der Radioaktivität und gleichzeitig in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen ein weniger steiler Anstieg der Radioaktivität zu beobachten wäre.

Um dies zu prüfen, wurde in etwa 80 Embryonen H^3 -DNA, der etwa 600 μg kaltes Thymidin/ml DNA-PBS zugesetzt waren, injiziert (diese Menge an kaltem Thymidin entsprach der zehnfachen Menge des in der injizierten H^3 -DNA gebundenen Thymidins). In der Regel wurden jeweils 3 Parallelproben zu je 3 oder 4 Embryonen zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion wie auf S. 41 beschrieben aufgearbeitet.

Die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion von H^3 -DNA zusammen mit kaltem Thymidin ist in Abb. 8 dargestellt. Wie der Vergleich der hier dargestellten Kurven mit denjenigen in Abb. 6 deutlich zeigt, unterscheidet sich diese Verteilung in dem Zeitraum zwischen 45 und 120 Stdn. nach der Injektion merklich von derjenigen in dem Versuch ohne Zusatz von kaltem Thymidin zur H^3 -DNA. So sinkt die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion des Dotters nach Erreichen des Maximums von etwa 50 % bei 40 Stdn. nicht schon nach 50 Stdn. (vgl. Abb. 6), sondern erst nach 70 Stdn. auf etwa 20 % bei 120 Stdn. ab (vgl. Abb. 8). Gleichzeitig nimmt die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen langsamer zu und erreicht daher 40 % nicht nach 80 Stdn. (vgl. Abb. 6), sondern erst nach 100 Stdn. (vgl. Abb. 8). Die gleichzeitige Injektion von H^3 -DNA und kaltem Thymidin hatte also den vorausgesagten Effekt; sowohl die Abnahme der Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion des Dotters als auch die Zunahme der Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen sind merklich verzögert.

Weiterhin ergab dieser Versuch, daß in der säureunlöslichen Fraktion des Dotters die Radioaktivität relativ schnell auf ein Minimum von

25 % zwischen 70 und 90 Stdn. absinkt, um dann wieder auf etwa 35 % bei 120 Stdn. anzusteigen. In dem Versuch ohne Zusatz von kaltem Thymidin zur H^3 -DNA dagegen sank die Radioaktivität in dieser Fraktion nie unter 35 %. Auf diesen zuletzt genannten Befund soll erst später näher eingegangen werden (vgl. S. 56).

Aus dem Ergebnis dieses Versuches kann geschlossen werden, daß nach Injektion von H^3 -Bakterien-DNA in den Dotter von Embryonen H^3 -Thymidin als Abbauprodukt dieser DNA auftritt. Ob jedoch das radioaktiv markierte wie auch das zugesetzte kalte Thymidin weiter ab- oder umgebaut oder aber in die DNA der Embryonen eingebaut werden, ist mit diesem Versuch allein nicht zu klären. Es war daher erforderlich, auch diejenige Substanz, an die die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen gebunden ist, zu identifizieren. Hierzu könnte entweder DNA aus den Embryonen isoliert und auf Radioaktivität geprüft werden oder aber die DNA der Embryonen selektiv durch Behandlung der Embryonen mit DNase zu säurelöslichen Produkten abgebaut und die Radioaktivität in der säurelöslichen sowie in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen gemessen werden. Von dieser letztgenannten Möglichkeit wurde hier Gebrauch gemacht, wobei zur Kontrolle einige Embryonen mit RNase anstelle von DNase behandelt wurden.

In etwa 50 Embryonen wurde H^3 -DNA injiziert. Jeweils 3 Parallelproben wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion aufgearbeitet. Für jede Probe wurden 3 Embryonen samt Dotter in 0,4 ml 0,01 M Tris, 0,003 M $MgCl_2$, pH 7,2, homogenisiert und nach Zugabe von 0,1 ml Tris- $MgCl_2$, die 100 μg DNase (Calbiochem) bzw. RNase (Calbiochem) enthielten, 2 Stdn. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Als Kontrollen wurden je 3 Embryonen in Tris- $MgCl_2$ homogenisiert und ebenfalls 2 Stdn. bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf etwa 4°C wurde das inkubierte Homogenat mit 0,5 ml 0,6 M TCA ausgefällt, 20 Min. bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert und mit 0,5 ml 0,3 M TCA gewaschen. Sedimente und TCA-Überstände wurden wie auf S. 39 beschrieben weiter verarbeitet.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Tabelle IV dargestellt. Nach Behandlung des Homogenates der Embryonen mit DNase befinden sich zu jedem der untersuchten Zeitpunkte fast 100 % der injizierten Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion der Embryonen. Dagegen ist nach RNase-Behandlung zu den verschiedenen Zeiten verschieden viel Radioaktivität sowohl in der säurelöslichen als auch in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen zu finden; dabei sind zum jeweiligen Zeitpunkt die Mengen an Radioaktivität in der säurelöslichen und säureunlöslichen Fraktion gleich denjenigen in den entsprechenden Fraktionen der Kontrollen. Bei den RNase-behandelten Proben ebenso wie bei den Kontrollen befindet sich in der säurelöslichen Fraktion nur so viel Radioaktivität wie dies auf Grund der Ergebnisse der vorangegangenen Versuche (vgl. S.39f. und Abb.5) zu erwarten ist.

Die nach Injektion von H^3 -DNA in der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen auftretende Radioaktivität ist also zu jedem der untersuchten Zeitpunkte DNase- aber nicht RNase-sensitiv; sie ist daher ausschließlich an DNA gebunden. Im Zusammenhang mit dem vorangegangenen Versuch (vgl. S. 46 f.) ergibt sich hieraus, daß in der säurelöslichen Fraktion des Dotters H^3 -Thymidin als Abbauprodukt der injizierten H^3 -DNA auftritt und dieses in die DNA der Embryonen eingebaut wird. Weiterhin ergibt sich hieraus, daß die Radioaktivität von noch eventuell vorhandener, nicht abgebauter H^3 -Bakterien-DNA nicht auf andere hochmolekulare Substanzen verlagert worden, sondern noch an die Bakterien-DNA gebunden ist.

Zur Unterstützung des Ergebnisses, daß die Abbauprodukte der injizierten H^3 -DNA von den Embryonen zur Neusynthese von DNA verwendet werden, kann auch der folgende Versuch herangezogen werden, in dem gezeigt wurde, daß H^3 -Thymidin prinzipiell in die DNA der Embryonen eingebaut werden kann.

In etwa 100 Embryonen wurde H^3 -Thymidin ($50 \mu\text{Ci/ml}$; spezifische Aktivität 23 Ci/mM) injiziert. In der Regel wurden jeweils 3 Parallelproben zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion aufgearbeitet. Für einen

Teil des Versuches wurden je Probe 3 Embryonen in Embryo und Dotter getrennt und wie auf S. 41 beschrieben aufgearbeitet. Für einen weiteren Teil des Versuches wurden je Probe 3 Embryonen samt Dotter in Tris-MgCl_2 homogenisiert und wie auf S. 47 beschrieben mit DNase, RNase oder ohne Enzym inkubiert und weiterverarbeitet.

Die Verteilung der Radioaktivität in säureunlöslicher und säurelöslicher Fraktion von Embryonen und Dotter zu verschiedenen Zeiten nach Injektion von H^3 -Thymidin ist in Abb. 9 dargestellt. In der säureunlöslichen Fraktion des Dotters steigt die Radioaktivität innerhalb der ersten 15 Stdn. nach der Injektion schnell von 0 auf 30 % an, sinkt nach 35 Stdn. langsam auf etwa 20 % bei 60 Stdn. und bleibt dann bis gegen Ende des Versuches bei 90 Stdn. unverändert. In der säurelöslichen Fraktion des Dotters nimmt die Radioaktivität sehr schnell von etwa 100 % zum Zeitpunkt der Injektion ab und nähert sich 5 % bei 60 bis 90 Stdn. In der säureunlöslichen Fraktion der Embryonen steigt die Radioaktivität während der ersten 15 Stdn. zunächst schnell auf 40 %, dann langsamer auf 55 % bei 35 Stdn. und dann wieder schneller auf 75 % bei 60 Stdn. und bleibt von diesem Zeitpunkt an unverändert. Die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion der Embryonen beträgt während des gesamten untersuchten Zeitraumes konstant etwa 2 %.

Das Ergebnis der Abbauprobversuche mit DNase und RNase nach Injektion des H^3 -Thymidins in den Dotter der Embryonen ist in Tabelle V dargestellt. Nach Behandlung der Embryonen mit DNase befinden sich fast 100 % der injizierten Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion der Embryonen. Bei den mit RNase behandelten Embryonen sowie bei den Kontrollen befindet sich dagegen nur so viel Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion wie auf Grund der Verteilung der Radioaktivität in den säurelöslichen Fraktionen von Embryonen und Dotter zu den untersuchten Zeitpunkten nach der Injektion des H^3 -Thymidins zu erwarten ist (vgl. S. 49 und Abb. 9).

Der zuletzt beschriebene Versuch zeigt, daß die Embryonen grundsätzlich H^3 -Thymidin, das in den Dotter injiziert wurde, in ihre DNA einbauen können. Aus der Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen ergibt sich außerdem, daß nicht nur in den Embryonen selbst, sondern auch im Dotter H^3 -Thymidin in DNase-sensitives Material eingebaut wird. Auf diesen Befund soll jedoch erst später eingegangen werden (vgl. S.57).

D. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil eines umfangreichen Experimentes, in dem bei einem höheren Organismus Gene eines Individuums mit Hilfe exogener DNA auf ein anderes Individuum übertragen werden sollen. Die Versuche schließen also an die klassischen Transformationsexperimente bei Bakterien (AVERY, MacLEOD und McCARTY 1944) an. Abweichend von diesen Versuchen bei Bakterien sind die entsprechenden Arbeiten an höheren Organismen (vgl. S. 5) trotz intensiver Bemühungen bisher erfolglos geblieben (die fraglichen Fälle, in denen Allophäne übertragen wurden, vgl. S. 5, sowie die Experimente bei Zellkulturen, vgl. S. 7, sollen hier nicht berücksichtigt werden). Es müssen daher für das vorliegende Problem die mutmaßlichen Ursachen, die zum Mißerfolg geführt haben, berücksichtigt werden.

Eine dieser Ursachen dürfte in der Schwierigkeit liegen, die transformierten Zellen ausfindig zu machen. In dem geplanten Transformationsexperiment kann diese Schwierigkeit durch die Wahl des Systems weitgehend ausgeschaltet werden, denn der Rezipient kann hier genetisch so konstituiert werden, daß er einzelne transformierte Melanoblasten, die normalerweise nicht als solche zu erkennen wären, zur Vermehrung veranlaßt (vgl. S. 15). Auf diese Weise könnte schließlich eine erfolgte Transformation an der Bildung einer Kolonie schwarzer Pigmentzellen erkannt werden.

Weiterhin dürfte zum Mißlingen der bisherigen Transformationsversuche beigetragen haben, daß die hochmolekulare Donor-DNA im Rezipienten eventuell schnell abgebaut (vgl. TSUMITA und IWANAGA 1963; KAY 1966; u.a.) und daher weder in die Zellen des Rezipienten aufgenommen noch in dessen DNA integriert wurde. Es erschien daher ratsam, vor Beginn des eigentlichen Transformationsexperimentes Untersuchungen über eine geeignete Form der Behandlung des Rezipienten mit Donor-DNA sowie über das Schicksal der Donor-DNA im Rezipienten durchzuführen.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen soll im folgenden diskutiert werden. Hieraus wird sich dann ergeben, wie das geplante Transformationsexperiment im einzelnen gestaltet werden muß und welche Chancen für die Aufnahme und Integration der Donor-DNA in den Rezipienten bestehen.

Qualität der eingesetzten DNA und ihre Verwendbarkeit in einem Transformationsexperiment. Für Versuche zur DNA-Aufnahme und Transformation ist eine Charakterisierung der eingesetzten DNA notwendig, da Interpretation und Aussagekraft der Experimente weitgehend von der Qualität dieser DNA abhängig sind (vgl. S. 7f.). Auf Grund der hier durchgeführten Charakterisierung stellen alle drei verschiedenen DNA-Präparate (Kalbsthymus-DNA, H^3 -DNA aus E. coli und H^3 -DNA aus S. typhimurium) reine, hochmolekulare DNA dar, die im Falle der Bakterien-DNA radioaktiv markiert ist (vgl. S. 28 ff.). Der hochmolekulare Charakter dieser DNA geht während des Hindurchdrückens der Lösung durch die sehr enge Injektionskanüle nicht verloren (vgl. S. 34 f.). Die Ergebnisse, die mit Hilfe dieser DNA-Präparate gewonnen wurden, sind daher geeignet, als Grundlage für weitere Experimente zum Transformationsproblem bei Zahnkarpfen zu dienen.

Die Tatsache, daß in der vorliegenden Arbeit alle Versuche mit heterologer und nicht mit homologer DNA (aus Zahnkarpfen) durchgeführt wurden, ändert nichts an der Aussagekraft der Ergebnisse, da - abgesehen von einer Ausnahme (LEDOUX 1965, vgl. S. 9) - sehr viele Autoren bei Versuchen an anderen höheren Organismen bzw. Zellkulturen zu gleichen Ergebnissen gelangten, wenn anstelle von heterologer DNA bei der Wiederholung der Versuche homologe DNA eingesetzt wurde (COCITO, PRINZIE und de SOMER 1962; BILLET, HAMILTON und NEWTH 1964; weitere Angaben vgl. LEDOUX 1965). Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß Versuche von großer Tragweite - wie Versuche zur Integration von Donor-DNA in die Rezipienten-DNA - mit homologer DNA wiederholt werden sollten, um eventuelle Unterschiede in der Wirkung von heterologer und homologer DNA fest-

stellen zu können. Für spätere Versuche ist daher der Einsatz von homologer DNA, also DNA aus Zahnkarpfen, erforderlich. Diese kann aus Mangel an anderem geeignetem Gewebe nur aus Hoden gewonnen werden. Die Methode zur Isolierung von DNA aus Hoden ist bereits ausgearbeitet (E. v. GROTHUSS, Diplomarbeit); die Versuche zur radioaktiven Markierung dieser DNA sind jedoch noch nicht abgeschlossen (M. SCHWAB, Diplomarbeit).

Behandlung des Rezipienten mit Donor-DNA. Wie die Versuche zur Behandlung der Embryonen mit DNA ergaben, hat DNA weder nach Zusatz zum Kulturmedium noch nach Injektion in verschiedene Regionen der Embryonen eine nachteilige Wirkung auf die Embryonen. Auch das Injizieren als solches wird von den Embryonen gut überstanden (vgl. S. 32 f.). Im Gegensatz zu niedermolekularen Substanzen wie Dihydroxyphenylalanin (U. HEINEKE, Diplomarbeit) oder Thymidin (eigene Untersuchungen) gelangt bei der Kultur der Embryonen in H^3 -DNA-haltigem Medium - gemessen an der Radioaktivität - keine DNA in die Embryonen. Ob dies auf der hochmolekularen Natur bzw. anderen Eigenschaften der DNA, auf Besonderheiten der Embryonen oder auf beidem beruht, kann hier nicht entschieden werden. Es hat sich allerdings gezeigt, daß die äußere Hülle der Embryonen, die anfangs für eine Barriere für den Eintritt der DNA gehalten wurde, nicht diese Barriere darstellt, da nach deren mechanischer Entfernung und Kultur der Embryonen in H^3 -DNA-haltigem Medium die Radioaktivität in den Embryonen nicht wesentlich erhöht ist (vgl. S. 33 f.). Demgegenüber gelangt die DNA durch Injektion sicher in die Embryonen und verbleibt in diesen für kürzere oder längere Zeit (vgl. S. 34 ff.).

Es ist also in allen späteren Transformationsversuchen bei Zahnkarpfen unumgänglich, die Donor-DNA in den Rezipienten zu injizieren. Hierbei stellt sich aber sogleich die weitere Frage, welche Regionen der Embryonen am besten für die DNA-Applikation geeignet sind. Aus den umfangreichen Versuchen hierzu geht eindeutig hervor, daß die Dotterre-

gion am besten für Einstich und Injektion geeignet ist. Selbst nach einem Zeitraum von 360 Stdn. nach der Injektion ist noch alle Radioaktivität in den Embryonen vorhanden (vgl. S. 37); dagegen ist nach Injektion der DNA in den Raum um die Herzanlage oder in die Dorsalregion schon nach 2 Stdn. die gesamte injizierte Radioaktivität im Kulturmedium zu finden (vgl. S. 36).

Bezüglich des vorliegenden Problems, Melanoblasten, die in den frühen Entwicklungsstadien der Embryonen aus der Neuralleiste auswandern, mit Hilfe von exogener DNA zu transformieren, ergeben diese Versuche, daß den Embryonen in diesen Stadien hochmolekulare Donor-DNA durch die Injektion in den Dotter zur Verfügung gestellt werden kann.

Schicksal der Donor-DNA nach Injektion in den Rezipienten. Von größtem Interesse für das Transformationsproblem ist die Frage, was mit der hochmolekularen H^3 -Bakterien-DNA nach Injektion in den Dotter der Embryonen geschieht. Wie schon an anderer Stelle erläutert (vgl. S. 38), erlaubt die vorgenommene Auftrennung in säureunlösliches und säurelösliches Material keine Antwort auf die Frage, ob die hochmolekulare Donor-DNA als solche in die Embryonen eingebaut wird; dagegen kann aus der kritischen Betrachtung der Verteilung der Radioaktivität in den säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktionen der Embryonen samt Dotter, der Embryonen ohne Dotter und des abgetrennten Dotters oder der Zellkerne und des zugehörigen Plasma-Dotter-Materials zumindest eine Antwort auf die Frage erhalten werden, ob die hochmolekulare Donor-DNA nach der Injektion in den Dotter den Embryonen unverändert zur Verfügung steht und welche Chancen für die Aufnahme und Integration dieser DNA in die Zellen der Embryonen bzw. in deren DNA bestehen. Hierbei kann auf Grund der Versuche zur Identifizierung der radioaktiv markierten Substanzen in den einzelnen Fraktionen (vgl. S. 45 ff.) davon ausgegangen werden, daß Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion an H^3 -Thymidin als Abbauprodukt der H^3 -Donor-DNA, Radioaktivität in der säureunlöslichen Frak-

tion dagegen an hochmolekulare DNA gebunden ist, die entweder noch H^3 -Donor-DNA und/oder Rezipienten-DNA, die durch den Einbau von Abbauprodukten der H^3 -Donor-DNA radioaktiv markiert wurde, darstellt.

Nach der Injektion in den Dotter der Embryonen ist die Donor-DNA vermutlich den Nucleasen des Dotters und - sofern ein Transport dieser DNA vom Dotter in den Embryo stattfindet - auch denjenigen von Blut und Embryo ausgesetzt. Es kann daher von vornherein damit gerechnet werden, daß zumindest ein Teil dieser DNA abgebaut wird. Ein solcher Abbau ist dadurch zu erkennen, daß in der säurelöslichen Fraktion der Embryonen samt Dotter Radioaktivität auftritt, während die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion abnimmt. Es zeigte sich, daß ein merklicher Abbau der Donor-DNA zu säurelöslichen Produkten erst 5 Stdn. nach der Injektion beginnt. Da bei der getrennten Untersuchung von Embryonen und Dotter Radioaktivität nur in der säurelöslichen Fraktion des Dotters, aber nicht in derjenigen der Embryonen zu finden ist (vgl. S. 41f.), erfolgt der Abbau der Donor-DNA offensichtlich vorwiegend im Dotter.

Mit zunehmendem Abbau der Donor-DNA erfolgt ein Einbau von radioaktiv markiertem Material in die Embryonen, und zwar in deren Zellkerne (vgl. S. 41f. bzw. S. 43f.). Dies dürfte in erster Linie auf dem Einbau von H^3 -Thymidin, das aus der abgebauten Donor-DNA stammt, in die DNA der Embryonen beruhen. Ob neben H^3 -Thymidin auch hochmolekulare Donor-DNA in die Zellkerne bzw. in die DNA der Embryonen aufgenommen und eingebaut wird, kann hier - wie schon mehrfach erwähnt - aus methodischen Gründen nicht entschieden werden (vgl. S. 38). Der Einbau des radioaktiv markierten Materials in die Embryonen ist dann am stärksten, wenn der Abbau der Donor-DNA sein Maximum erreicht hat; er läßt nach, sobald die Konzentration des aus der Donor-DNA stammenden H^3 -Thymidins im Dotter sinkt. Da das hochmolekulare radioaktiv markierte Material im Dotter ab 40 Stdn. nach der Injektion nur noch sehr langsam abnimmt, kann zunächst angenommen werden, daß von diesem Zeitpunkt an nur noch ein sehr geringer Abbau der Donor-DNA stattfindet; selbst nach 140 Stdn. sind noch 35 % hochmolekulares radioaktiv markiertes Material im Dotter zu finden.

Von Bedeutung für das vorliegende Problem ist nun, ob dieses hochmolekulare radioaktiv markierte Material im Dotter zu diesem Zeitpunkt noch unveränderte, nicht aufgenommene und dem Embryo noch zur Verfügung stehende Donor-DNA darstellt. Da bei der Trennung von Embryonen und Dotter stets die als Erythrocyten und deren Vorstufen interpretierten feulgenpositiven Strukturen mit in das Dottermaterial gelangen (vgl. S. 40), könnte die H^3 -DNA im abgetrennten Dotter folgende DNA-Arten darstellen bzw. sich aus diesen zusammensetzen:

- a) noch nicht aufgenommene hochmolekulare Donor-DNA,
- b) in die feulgenpositiven Strukturen aufgenommene hochmolekulare Donor-DNA und
- c) in diesen Strukturen neusynthetisierte Rezipienten-DNA, in die H^3 -Thymidin der abgebauten Donor-DNA eingebaut wurde.

Während hier - ebenso wie im Falle der eigentlichen Embryonen (vgl. S. 38 und S. 55) - über die Aufnahme von hochmolekularer Donor-DNA in Strukturen des abgetrennten Dottermaterials keine Aussage gemacht werden kann, lassen die vorliegenden Untersuchungen zumindest eine Entscheidung darüber zu, ob ein Einbau des aus der abgebauten Donor-DNA stammenden H^3 -Thymidins in diese Strukturen stattfindet und ob nach 140 Std. noch nicht aufgenommene hochmolekulare Donor-DNA vorliegt.

Einen Hinweis dafür, daß in dem von den Embryonen abgetrennten Dottermaterial eine Neusynthese von DNA stattfinden kann, ergab sich aus den Versuchen zur Identifizierung der Substanzen, an die die Radioaktivität in säureunlöslicher und säurelöslicher Fraktion gebunden ist (vgl. S. 47 f.). Im Gegensatz zur Injektion von H^3 -Donor-DNA allein bewirkte die gleichzeitige Injektion von H^3 -Donor-DNA und kaltem Thymidin zunächst eine verstärkte Abnahme des säureunlöslichen radioaktiv markierten Materials im Dotter auf 25 %; gegen Ende des Versuches beträgt dieses Material jedoch wieder 35 % wie in dem Versuch ohne Zusatz von kaltem Thymidin. Dies kann in der Weise gedeutet werden, daß - ebenso wie im eigentlichen Embryo (vgl. S. 55) - auch im Dotter ein Einbau von aus der abgebauten Donor-DNA stammendem H^3 -Thymidin in hochmolekulares Material erfolgt, der durch Zusatz von kaltem Thymidin verzögert wird.

Auch H^3 -Thymidin, das in den Dotter der Embryonen injiziert wurde, wird zum Teil in hochmolekulares Material im Dotter eingebaut (vgl. S. 50). Somit besteht das hochmolekulare radioaktiv markierte Material in dem von den Embryonen abgetrennten Dottermaterial zum Teil aus neusynthetisierter Rezipienten-DNA und vermutlich zu einem gegen Ende des Versuches immer kleiner werdenden Teil aus nicht aufgenommenener hochmolekularer Donor-DNA.

Eine Möglichkeit, den Anteil dieser nicht aufgenommenen hochmolekularen Donor-DNA an der im Dotter vorhandenen H^3 -DNA zu ermitteln, ergibt sich aus dem Vergleich der Menge an hochmolekularem radioaktiv markiertem Material im abgetrennten Dotter mit der Menge an diesem Material in der Plasma-Dotter-Fraktion. Während im abgetrennten Dotter das hochmolekulare radioaktiv markierte Material ab 40 Stdn. nach der Injektion nahezu konstant 35 % beträgt, nimmt dasselbe Material in der Plasma-Dotter-Fraktion stetig ab. Dabei ist von diesem Zeitpunkt an die Differenz zwischen Dotter und Plasma-Dotter-Material stets gleich der Differenz zwischen der Kernfraktion und den vom Dotter befreiten Embryonen. Da die Kernfraktion auch die Zellkerne der Erythrocyten und deren Vorstufen enthält, entspricht diese Differenz vermutlich dem Anteil der neusynthetisierten Rezipienten-DNA und eventuell aufgenommenener hochmolekularer Donor-DNA an der im abgetrennten Dotter enthaltenen H^3 -DNA. Dagegen repräsentiert das hochmolekulare radioaktiv markierte Material in der Plasma-Dotter-Fraktion, die nachweislich keine Zellkerne enthält, mit großer Wahrscheinlichkeit noch nicht aufgenommene hochmolekulare Donor-DNA.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich daher, daß sich das hochmolekulare radioaktiv markierte Material, das 140 Stdn. nach der Injektion der Donor-DNA in den Dotter der Embryonen 35 % beträgt, zu etwa 30 % aus neusynthetisierter Rezipienten-DNA und eventuell aufgenommenener hochmolekularer Donor-DNA und nur zu etwa 5 % aus noch nicht aufgenommenener hochmolekularer Donor-DNA zusammensetzt.

Die in den Dotter der Embryonen injizierte H^3 -Donor-DNA wird also nur äußerst langsam abgebaut. Dieser Befund weicht von den Ergebnissen anderer Untersuchungen über das Schicksal exogener DNA in höheren Objekten ab (vgl. GARTLER 1960; LEDOUX 1965; ROBINS und TAYLOR 1968); so stellten viele Autoren bereits 1 Std. nach Zugabe der Donor-DNA zu Zellkulturen bzw. nach Injektion der Donor-DNA in Mäuse einen Abbau von etwa 50 % der zugeführten DNA fest (TSUMITA und IWANAGA 1963; KAY 1966). Daß der Abbau der H^3 -Donor-DNA nach Injektion in den Dotter der Embryonen sehr viel langsamer erfolgt, beruht vermutlich darauf, daß im Dotter allgemein nur eine geringe Abbauaktivität herrscht und das Dottermaterial erst im Laufe der drei Wochen dauernden Entwicklung der Embryonen langsam aufgebraucht wird.

Schließlich soll noch auf eine Besonderheit der Ergebnisse der getrennten Untersuchung von Kern- und Plasma-Dotter-Fraktion eingegangen werden. Es hatte sich gezeigt, daß in der Kernfraktion unmittelbar nach der Injektion der H^3 -Donor-DNA in den Dotter mehr hochmolekulares radioaktiv markiertes Material vorhanden ist als 15 Stdn. später; von 30 % zum Zeitpunkt der Injektion sinkt es auf 15 % bei 15 Stdn. In demselben Zeitraum nimmt das niedermolekulare radioaktiv markierte Material in der Plasma-Dotter-Fraktion von 0 % auf 15 % zu, dagegen bleibt das hochmolekulare radioaktiv markierte Material in dieser Fraktion konstant 70 % (vgl. S. 43f.). Dieser Befund wurde zunächst als Artefakt gewertet, da es unwahrscheinlich ist, daß die injizierte hochmolekulare Donor-DNA sofort nach der Injektion in die Zellkerne der Embryonen aufgenommen, später aber wieder abgegeben und abgebaut wird. Bei der Wiederholung des Experimentes für den Zeitraum zwischen 0 und 30 Stdn. nach der Injektion wurde jedoch der Verlauf der Kurven reproduziert (vgl. S. 4), so daß dieses Ergebnis wohl als reell zu betrachten ist.

Dieses Ergebnis kann folgendermaßen gedeutet werden. Nach der Injektion der hochmolekularen H^3 -Donor-DNA in den Dotter der Embryonen lagert sich diese DNA vermutlich zum größten Teil an die Strukturen und löslichen Proteine von Plasma und Dotter an. Unmittelbar nach der Injektion, wenn also noch sehr viel hochmolekulare Donor-DNA im Dotter vor-

handen ist, kann eventuell ein Teil dieser DNA, der weniger fest gebunden ist, während des Homogenisierens der Embryonen umgelagert werden und sich an die Zellkerne der Embryonen anlagern, so daß hochmolekulares radioaktiv markiertes Material in der Kernfraktion erscheint. Diese weniger fest an Plasma- oder Dotterbestandteile gebundene Donor-DNA ist vermutlich leichter der Wirkung von DNasen ausgesetzt und wird daher früher als die übrige Donor-DNA abgebaut. Es wird daher einige Zeit nach der Injektion immer weniger hochmolekulares radioaktiv markiertes Material in der Kernfraktion erscheinen.

Eine andere Möglichkeit der Interpretation der ungewöhnlichen Verteilung des radioaktiv markierten Materials innerhalb der ersten Stunden nach der Injektion der Donor-DNA wäre, daß sich die Donor-DNA nicht erst beim Homogenisieren umlagert, sondern sich bereits in vivo an bestimmte Strukturen angelagert hat, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen mit den Zellkernen sedimentieren. Solche Strukturen könnten z. B. DNA-haltige Dotterschollen sein, wie sie kürzlich aus Amphibien-Oocyten isoliert wurden (BALTUS, HANOCQ-QUERTIER und BRACHET 1968; HANOCQ-QUERTIER, BALTUS, FICQ und BRACHET 1968). Jedoch ist bisher m.W. noch nicht bekannt, ob diese Strukturen auch in Fisch-Oocyten auftreten. Mitochondrien und Ribosomen, die in Oocyten von Amphibien (DAWID 1966; DAWID und BROWN 1970) und von Fischen (WEGMANN 1970) sehr zahlreich sind und an die ebenfalls eine Anlagerung der Donor-DNA möglich ist, kommen hier nicht in Betracht, da sie erst bei sehr viel größeren Zentrifugalkräften sedimentieren als sie für die Herstellung der Kernfraktion angewandt wurden.

Über die Funktion der DNA in den Dotterschollen ist noch nichts bekannt. BALTUS u. Mitarb. vermuten, daß dieser DNA irgendeine Kontrollfunktion bezüglich des Abbaues von Dottermaterial während der Entwicklung der Embryonen zukommt. Daß die Dotterschollen-DNA einen "prospektiven Pool von Desoxyribosiden" darstellt, halten die genannten Autoren für weniger wahrscheinlich. Sollte letzteres aber doch der Fall sein, dann wäre die Abnahme von hochmolekularer Donor-DNA in der Kernfraktion innerhalb der ersten Stunden nach der Injektion in die Embryonen damit zu erklären, daß an Dotterschollen angelagerte Donor-DNA zusammen mit Dotterschollen-DNA abgebaut wird.

Schlußbemerkung. Auf Grund der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen ergibt sich für das geplante Transformationsexperiment bei Zahnkarpfen folgendes. Hochmolekulare Donor-DNA kann den Embryonen nur durch Injektion in den Dotter zur Verfügung gestellt werden. Ein Abbau der Donor-DNA findet offensichtlich nur im Dotter statt. Da dieser Abbau sehr langsam vor sich geht, - 140 Stdn. nach der Injektion sind im Dotter noch etwa 5 % der Donor-DNA in hochmolekularer Form vorhanden - steht den Embryonen über einen langen Zeitraum hochmolekulare Donor-DNA zur Verfügung. Es bestehen daher gute Chancen für eine Aufnahme und Integration der Donor-DNA in die Melanoblasten der frühen Embryonalstadien (vgl. S. 15).

Da in der Embryonalentwicklung der einzelnen Zahnkarpfenarten sowie deren Bastarde keine Unterschiede festgestellt wurden (TAVOLGA 1949), dürften sich die Ergebnisse, die hier an Embryonen von *P. maculatus* als Rezipienten gewonnen wurden, auch an denjenigen von anderen Arten sowie deren Bastarden wiederholen lassen.

Ob Aufnahme und Integration der Donor-DNA in den Rezipienten erfolgen, kann nur durch weitere Experimente, die bereits in Angriff genommen wurden, geklärt werden. Hierzu ist der Einsatz von schweremarkierter Donor-DNA notwendig. Bei diesen Versuchen sollen neben heterologer auch homologe Donor-DNA sowie Donor-DNA verschiedenen Molekulargewichtes verwendet werden. Außerdem werden parallel zu diesen Versuchen auch autoradiographische Untersuchungen notwendig sein, um den Transport der Donor-DNA bzw. deren Abbauprodukte vom Dotter in den Embryo verfolgen sowie die Empfängerzellen im Embryo lokalisieren zu können. Erst dann soll das eigentliche Transformationsexperiment durchgeführt werden. Hierzu werden zur Zeit mehrere Macromelanophorengene in das Donor-Genom eingekreuzt, so daß die Anzahl dieser Gene in der Donor-DNA angereichert ist und dadurch größere Chancen für einen Erfolg des Transformationsexperimentes bestehen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit stellt den ersten Abschnitt eines Forschungsprojektes an Embryonen von lebendgebärenden Zahnkarpfen dar, bei dem Melanoblasten, die sich normalerweise zu Micromelanophoren differenzieren, durch exogene DNA genetisch transformiert werden sollen, so daß aus ihnen Macromelanophoren hervorgehen.

Es wurden Methoden zur Gewinnung und in-vitro-Kultur von Embryonen als Rezipienten für die Donor-DNA erarbeitet. Anschließend wurde untersucht, auf welche Weise den Embryonen hochmolekulare Donor-DNA zugeführt werden kann. Es zeigte sich, daß diese nicht über das Kulturmedium sondern nur durch Injektion in den Dotter appliziert werden kann. Unabhängig vom Entwicklungsstadium behalten die Embryonen die gesamte in den Dotter injizierte DNA. Nach Injektion in die Herz- oder Dorsalregion wird die DNA innerhalb kurzer Zeit zum größten Teil in das Kulturmedium abgegeben.

Während des Hindurchdrückens der viskosen DNA-Lösung durch die Injektionskanüle geht der hochmolekulare Charakter der DNA nicht verloren; das Mindestmolekulargewicht von 5×10^5 , das bei Bakterien Voraussetzung für eine erfolgreiche Transformation ist, wird nicht unterschritten.

Ferner wurde das Schicksal der in den Dotter der Embryonen injizierten Donor-DNA verfolgt. Es findet nur ein sehr langsamer Abbau der hochmolekularen Donor-DNA im Dotter statt, so daß diese über einen sehr langen Zeitraum für eine eventuelle Transformation zur Verfügung steht. Selbst 140 Stdn. nach der Injektion sind im Dotter immer noch etwa 5 % der Donor-DNA in hochmolekularer Form vorhanden. Ob die Donor-DNA tatsächlich in das Genom des Rezipienten integriert wird, kann hier nicht entschieden werden. Die Aussichten hierfür können jedoch positiv beurteilt werden.

LITERATUR

- ALLOWAY, J.L.: Further observations on the use of pneumococcus extracts in effecting transformation of type in vitro. J. Exp. Med. 57, 265-278 (1933).
- AMOS, H.: Protamin enhancement of RNA uptake by cultured chick cells. Biochem.Biophys. Res. Commun. 5, 1-4 (1961).
- ANDERS, F.: Tumor formation in platyfish-swordtail hybrids as a problem of gene regulation. Experientia 23, 1-10 (1967).
- ASTAUROV, B.L., T.A. BEDNIAKOVA, S.L. GINSBURG, I.B. ZBARSKY, and S.P. RAMENSKOYA: An attempt to induce hereditary changes in the silkworm (*Bombyx mori* L.) by means of DNA injection from a genetically different strain. Dokl.Acad. Nauk SSSR 134, 449-451 (1960).
- AVERY, O.T., C.M MacLEOD, and M. McCARTY: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J. Exp. Med. 79, 137-157 (1944).
- AYAD, S.R., and M. FOX: DNA uptake by a mutant strain of lymphoma cells. Nature 220, 35-38 (1968).
- BALTUS, E., J. HANOCQ-QUERTIER, and J. BRACHET: Isolation of desoxyribonucleic acid from the yolk platelets of *Xenopus laevis* oocytes. Proc. N.A.S. 61, 469-476 (1968).
- BEARN, J.G., and K.S. KIRBY: Failure of deoxyribonucleic acid to produce pigment changes in the albino rat. Exp.Cell Res. 17, 547-549 (1959).
- BEATTY, R.A., and B. BILLET: Genetics of *Gametes*. VI. Attempted genetic transformation in the rabbit. Proc.Roy.Soc. Edinburgh Sect. B. Biol. 68 (6), 83-90 (1961).

- BEAVEN, G.H., E.R. HOLIDAY, and E.A. JOHNSON: Optical properties of nucleic acids and their components. In E. CHARGAFF and J.N. DAVIDSON: The Nucleic Acids I, Academic Press, New York 1955, 493-553.
- BECKER-CARUS, C.: Über die Melanophorenentwicklung und Musterbildung bei den Xiphophorini (Pisces). Sitz-ber.Ges.Naturforsch. Freunde, Berlin (N.F.) 5, 136-145 (1965).
- BENDICH, A., T. WILCZOK, and E. BORENFREUND: Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. Science 148, 374-376 (1965).
- BENOIT, J., P. LEROY, C. VENDRELY, et R. VENDRELY: Des mutations somatiques dirigées sont-elles possibles chez les Oiseaux? Compt. Rend. Acad. Sci. 244, 2320-2321 (1957).
- BENOIT, J., P. LEROY, C. VENDRELY, et R. VENDRELY: Phénotype du bec des canetons de première et deuxième générations provenant de canards Pékin antérieurement traités à l'acide désoxyribonucléique de canard Khaki Campbell. Compt.Rend.Acad.Sci. 247, 1049-1052 (1958).
- BENOIT, J., P. LEROY, C. VENDRELY, and R. VENDRELY: Experiments on Pekin ducks treated with DNA from Khaki Campbell ducks. Trans. N.Y. Acad. Sci. 22, 494-503 (1960).
- BENOIT, J., P. LEROY, R. VENDRELY, et C. VENDRELY: Modifications de caractères raciaux du canard Pékin par l'acide désoxyribonucléique de canard Khaki Campbell et leur transmission à la descendance. Biochem.Pharmacol. 4, 181-194 (1960).
- BENSCH, K.G., and D.W. KING: Incorporation of heterologous deoxyribonucleic acid into mammalian cells. Science 133, 381-382 (1961).
- BERRY, G.P., and H.M. DEDRICK: A method for changing the virus of rabbit fibroma (Shope) into that of infectious myxomatosis (Sana-relli). J. Bact. 31, 50-51 (1936).
- BILLET, F.S., L. HAMILTON, and D.R. NEWTH: A failure to transform metazoan somatic cells by DNA. Heredity 19, 259-269 (1964).

- BORENFREUND, E., and A. BENDICH: A study of the penetration of mammalian cells by deoxyribonucleic acids. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 81-91 (1961).
- BRACHET, J.: The metabolism of nucleic acids during embryonic development. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 12, 18-27 (1947).
- BRADLEY, T.R., R.A. ROOSA, and L.W. LAW: DNA transformation studies with mammalian cells in culture. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60, 127-137 (1962).
- BRAY, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* 1, 279-285 (1960).
- BURTON, K.: A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62, 315-323 (1956).
- CAMPBELL, A.M.: Episomes. In E.W. CASPARI and J.M. THODAY: *Advances in Genetics* 11, Academic Press, New York, London 1962, 101-145.
- CASPARI, E.W., and S. NAWA: A method to demonstrate transformation in *Ephestia*. *Z. Naturforsch.* 20b, 281-284 (1965).
- CASPERSSON, T.: Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. *Skand. Arch. Physiol.* 73, Suppl. 8, 1-151 (1936).
- CASPERSSON, T.: Über die Rolle der Desoxyribonukleinsäure bei der Zellteilung. *Chromosoma* 1, 147-156 (1939/40).
- CATLIN, B.W.: Extracellular desoxyribonucleic acid of bacteria and a desoxyribonuclease inhibitor. *Science* 124, 441-442 (1956).
- CATLIN, B.W.: Transformation of *Neisseria meningitidis* by desoxyribonucleates from cells and from culture slime. *J. Bact.* 79, 579-590 (1960).

- CATLIN, B.W.: Interspecific transformation of *Neisseria* by culture slime containing deoxyribonucleate. *Science* 131, 608-610 (1960).
- CHARGAFF, E.: Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* 6, 201-209 (1950).
- CHARGAFF, E., and ZAMENHOF, S.: The isolation of highly polymerized deoxypentosenucleic acid from yeast cells. *J.Biol.Chem.* 173, 327-335 (1948).
- COCITO, C., A. PRINZIE, and P. de SOMER: Uptake by mammalian cells of nucleic acids combined with a basic protein. *Experientia* 18, 218-220 (1962).
- DAWID, I.B.: Evidence for the mitochondrial origin of frog egg cytoplasmic DNA. *Proc. N.A.S.* 56, 269-276 (1966).
- DAWID, I.B., and D.D. BROWN: The mitochondrial and ribosomal DNA components of oocytes of *Urechis caupo*. *Develop. Biol.* 22, 1-14 (1970).
- DOUNCE, A.L.: The isolation of nuclei from tumor cells. *Exp.Cell Res. Suppl.* 9, 126-143 (1963).
- EPHRUSSI-TAYLOR, H., and T.C. GRAY: Genetic studies of recombining DNA in pneumococcal transformation. *J.Gen.Physiol.* 49, Suppl., 211-231 (1966).
- FAHMY, O.G., and M.J. FAHMY: Induction of mutations by deoxyribonucleic acid in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 191, 776-779 (1961).
- FAHMY, O.G., and M.J. FAHMY: Genetic properties of exogenous deoxyribonucleic acid at various levels of degradation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 207, 507-510 (1965).

- FEULGEN, R. und H. ROSSENBECK: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z.physiol. Chem.* 135, 203-248 (1924).
- FINK, R.M., and K. FINK: Utilization of radiocarbon from thymidine and other precursors of ribonucleic acid in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 237, 2289-2290 (1962).
- FOX, A.S., and S.B. YOON: DNA-induced transformation in *Drosophila*: locus-specificity and the establishment of transformed stocks. *Proc. N.A.S.* 67, 1608-1615 (1970).
- FOX, M., B.W. FOX, and S.R. AYAD: Evidence for genetic expression of integrated DNA in lymphoma cells. *Nature* 222, 1086-1087 (1969).
- FREDERIC, J., et J. CORIN-FREDERIC: Modifications des chromosomes et du caryotype dans des cellules de Poulet cultivées in vitro en présence d'acides désoxyribonucléiques de veau. *C.R. Soc. Biol.* 156, 742-745 (1962).
- GARTLER, S.M.: Cellular uptake of deoxyribonucleic acid by human tissue culture cells. *Nature* 184, 1505-1506 (1959).
- GARTLER, S.M.: Demonstration of cellular uptake of polymerized DNA in mammalian cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 127-131 (1960).
- GIERER, A. und G. SCHRAMM: Die Infektiosität der Nucleinsäure aus Tabakmosaikvirus. *Z.Naturforsch.* 11b, 138-142 (1956).
- GLICK, J.L., and A.R. GOLDBERG: Inhibition of L1210 tumor growth by thymus DNA. *Science* 149, 997-998 (1965).
- GLICK, J.L., and A.R. GOLDBERG: The action of thymus DNA on L1210 leukemia cells. *Trans.N.Y.Acad.Sci.* 28, 741-753 (1966).

- GLICK, J.L., and A.P. SALIM: DNA-induced pigment production in a hamster cell line. *J.Cell Biol.* 33, 209-212 (1967).
- GOODGAL, S.H., and R.M. HERRIOTT: Studies on transformation of *Haemophilus influenzae*. In W.D. McELROY and B. GLASS: *Chemical Basis of Heredity*, Johns Hopkins Press, Baltimore 1957, 336-350.
- GRIFFITH, F.: The significance of pneumococcal types. *J.Hyg. (London)* 27, 113-159 (1928).
- GURNEY, T., Jr., and M.S. FOX: Physical and genetic hybrids formed in bacterial transformation. *J. Mol.Biol.* 32, 83-100 (1968).
- HADORN, E.: *Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955.
- HANOCQ-QUERTIER, J., E. BALTUS, A. FICQ, and J. BRACHET: Studies on the DNA of *Xenopus laevis* oocytes. *J.Embryol.Exp.Morph.* 19, 273-282 (1968).
- HARBERS, E.: *Die Nucleinsäuren*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964.
- HARBERS, E., and C. HEIDELBERGER: Studies on nucleic acid biosynthesis in Ehrlich ascites cells suspended in a medium permitting growth. *J.Biol.Chem.* 234, 1249-1254 (1959).
- HILL, M.: Intercellular passage of tritium-thymidine labeled DNA from donor lymphocytes to recipient bone marrow cells. *Exp. Cell Res.* 28, 21-26 (1962).
- HILL, M., and J. HUPPERT: Fate of exogenous mouse DNA in chicken fibroblasts in vitro non-conservative preservation. *Biochim. Biophys. Acta* 213, 26-35 (1970).

- HOTCHKISS, R.D.: Études chimiques sur le facteur transformant du pneumocoque. "Les unités biologiques douées de continuité génétique". C.N.R.S. (Paris) 8, 57-65 (1948).
- HOTCHKISS, R.D.: The role of desoxyribonucleate in bacterial transformation. In W. McELROY and B. GLASS: Phosphorus Metabolism 2, Johns Hopkins Press, Baltimore 1952, 426-436.
- HUMM, D.G., and R.S. YOUNG: The embryological origin of pigment cells in platyfish-swordtail hybrids. Zoologica 41 (1), 1-10 (1956).
- JOKLIK, W.K.: The poxviruses. Bacteriol. Rev. 30, 33-66 (1966).
- JOKLIK, W.K., J.H. HOLMES, and M. BRIGGS: The reactivation of poxviruses. II. Properties of the reactivable particles. Virology 11, 202-218 (1960).
- JOKLIK, W.K., G.M. WOODROOFE, J.H. HOLMES, and F. FENNER: The reactivation of poxviruses. I. Demonstration of the phenomenon and techniques of assay. Virology 11, 168-184 (1960).
- KAISER, A.D.: The production of phage chromosome fragments and their capacity of genetic transfer. J.Mol.Biol. 4, 275-287 (1962).
- KAY, E.R.M.: Incorporation of deoxyribonucleic acid by mammalian cells in vitro. Nature 191, 387-388 (1961).
- KAY, E.R.M.: Incorporation of DNA by cells of the Ehrlich Lettré ascites carcinoma. Trans. N.Y. Acad. Sci. 28, 726-740 (1966).
- KAY, E.R.M., N.S. SIMMONS, and A.L. DOUNCE: An improved preparation of sodium desoxyribonucleate. J.Amer.Chem.Soc. 74, 1724-1726 (1952).
- KELLENBERGER, G., M.L. ZICHICHI, and J.J. WEIGLE: Exchange of DNA in the recombination of bacteriophage λ . Proc.N.A.S. 47, 869-878 (1961).

- KING, E.J.: The colorimetric determination of phosphorus. *Biochem. J.* 26, 292-297 (1932).
- KRAUS, L.M.: Formation of different haemoglobins in tissue culture of human bone marrow treated with human deoxyribonucleic acid. *Nature* 192, 1055-1057 (1961).
- LEDOUX, L.: Uptake of DNA by living cells. *Progr.Nucl.Acid Res. Mol. Biol.* 4, 231-267 (1965).
- LEDOUX, L., P. GALAND, and R. HUART: Nucleic acids and protein metabolism in barley seedlings. II. Interrelations of the different organs. *Exp. Cell Res.* 27, 132-136 (1962).
- LEDOUX, L., and R. HUART: Fate of exogeneous bacterial deoxyribonucleic acids in barley seedlings. *J.Mol.Biol.* 43, 243-262 (1969).
- LERMAN, L.S., and L.J. TOLMACH: Genetic transformation. I. Cellular incorporation of DNA accompanying transformation in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* 26, 68-82 (1957).
- LEUCHTENBERGER, C., R. LEUCHTENBERGER, and E. UYEKI: Cytological and cytochemical changes in livers of white mice following intraperitoneal injections of DNA preparations from breast cancers of agouti C3H mice. *Proc.N.A.S.* 44, 700-705 (1958).
- LITT, M., J. MARMUR, H.E. EPHRUSSI-TAYLOR, and P. DOTY: The dependence of pneumococcal transformation on the molecular weight of deoxyribose nucleic acid. *Proc. N.A.S.* 44, 144-152 (1958).
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FAIR, and R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275 (1951).
- LURIA, S.E., and J.E. DARNELL, Jr.: *General Virology*, John Wiley and Sons, Inc., New York, London, Sydney 1968.
- MARMUR, J.: A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-219 (1961).

- McCARTY, M., and O.T. AVERY: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *J.Exp.Med.* 83, 89-96 (1946).
- MEJBAUM, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. *Z.physiol.Chem.* 258, 117-120 (1939).
- MESELSON, M., and J.J. WEIGLE: Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage. *Proc.N.A.S.* 47, 857-868 (1961).
- MONROY, A., H. ISHIDA, and E. NAKANO: The pattern of transfer for the yolk material to the embryo during the development of the teleostean fish, *Oryzias latipes*. *Embryologia* 6, 151-158 (1961).
- NAWA, S., and M. YAMADA: Hereditary change in *Ephestia* after treatment with DNA. *Genetics* 58, 573-584 (1968).
- NICOLAIEFF, A., and M.R. CHEVALLIER: An electron microscopic study of the relation between length and transforming activity of *H. influenzae* DNA. *Molec. Gen. Genetics* 109, 269-277 (1970).
- ÖKTAY, M.: Über genbedingte rote Farbmuster bei *Xiphophorus maculatus*. *Mitt. Hamb. Zool. Mus. Inst.*, Kosswig-Festschrift 1964, 133-157.
- OÖRDT, G.J. van: The duration of life of the spermatozoa in the fertilized female of *Xiphophorus helleri* Regan. *Tijdschr. Nederlandsche Dierkund. Vereen.* ser.3, 1, 77-80 (1928).
- OPPENOOORTH, W.F.F.: New possibilities in yeast breeding. *Wallerstein Communications* 24, 29-45 (1961).

- OTTOLENGHI, E., and R.D. HOTCHKISS: Appearance of genetic transforming activity in pneumococcal cultures. *Science* 132, 1257-1258 (1960).
- OTTOLENGHI-NIGHTINGALE, E.: Induction of melanin synthesis in albino mouse skin by DNA from pigmented mice. *Proc.N.A.S.* 64, 184-189 (1969).
- RAVIN, A.W.: The genetics of transformation. *Advances in Genetics* 10, 61-163 (1961).
- ROBINS, A.B., and D.M. TAYLOR: Nuclear uptake of exogenous DNA by mammalian cells in culture. *Nature* 217, 1228-1231 (1968).
- ROSENBERG, B.H., F.M. SIROTNAK, and L.F. CAVALIERI: On the size of genetic determinants in pneumococcus and the nature of the variables involved in transformation. *Proc.N.A.S.* 45, 144-156 (1959).
- SCHAEFFER, P.: Transformation. In I.C. GUNSALUS and R.Y. STANIER: *The Bacteria* 5, Academic Press, New York 1964, 87-153.
- SCHAUMLÖFFEL, E. und E.H. GRAUL: Vergleichende Untersuchungen mit neuen Szintillationschemikalien. *Atompraxis* 13, 260-262 (1967).
- SCHILDKRAUT, C.L., J. MARMUR, and P. DOTY: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. *J.Mol.Biol.* 4, 430-443 (1962).
- SCHIMIZU, T., S. SKOYAMA, and M. IWAFUCHI: Nuclear uptake of deoxyribonucleic acid by Ehrlich ascites-tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 55, 795-798 (1962).
- SHESTAKOV, S.V., and N.T. KHYEN: Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Molec. Gen. Genetics* 107, 372-375 (1970).

- SIA, R.H.P., and M.H. DAWSON: In vitro transformation of pneumococcal types. II. The nature of the factor responsible for the transformation of pneumococcal types. *J.Exp.Med.* 54, 701-710 (1931).
- SIROTNAK, F.M., and D.J. HUTCHISON: Absorption of deoxyribonucleic acid by mouse lymphoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 36, 246-248 (1959).
- SMITH, A.G., and H.R. CRESS: Effect of tumor deoxyribonucleic acid upon tissue cultures of fibroblasts. *Lab. Invest.* 10, 898-907 (1961).
- SMITHBERG, M.: An enzymatic procedure for dechorionating the fish embryo, *Oryzias latipes*. *Anat. Rec.* 154, 823-829 (1966).
- SMITHIES, W.R., and N.E. GIBBONS: The deoxyribose nucleic acid slime layer of some halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 1, 614-621 (1955).
- SMULL, C.E., M.F. MALLETT, and E.H. LUDWIG: The use of basic proteins to increase the infectivity of enterovirus ribonucleic acid. *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 5, 247-249 (1961).
- SVOBODA, J., and V. HAŠKOVÁ: Failure to produce somatic changes between strains of ducks by means of specific DNA. *Folia Biologica (Prag)* 6, 402-403 (1959).
- SZYBALSKA, E.H., and SZYBALSKI, W.: Genetics of human cell lines. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc. N.A.S.* 48, 2026-2034 (1962).
- SZYBALSKI, W.: Use of cesium sulfate for equilibrium density gradient centrifugation. In S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN: *Methods in Enzymology* 12B, Academic Press, New York, London 1968, 330-360.

- TAKAHASHI, I., and N.E. GIBBONS: Effect of salt concentration on the extracellular nucleic acids of *Micrococcus halodenitricans*. *Can.J.Microbiol.* 3, 687-694 (1957).
- TAVOLGA, W.N.: Embryonic development of the platyfish (*Platyepocilus*), the swordtail (*Xiphophorus*), and their hybrids. *Bull. Americ. Mus. Nat. Hist.* 94, 165-229 (1949).
- TSUMITA, T., and M. IWANAGA: Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. *Nature* 198, 1088-1089 (1963).
- VIELKIND, J.: Quantitative Bestimmung der Nucleinsäuren in Muskel- und Tumorgewebe von lebendgebärenden Zahnkarpfenbastarden (*Poeciliidae*). Diplomarbeit, Universität Gießen 1968.
- WACKER, A., und L. LASCHET: Übertragung der Streptomycin-Empfindlichkeit bei *E. coli*. *Arzneimittel-Forsch.* 10, 488-489 (1960).
- WEGMANN, I.: Untersuchungen zur Dotterbildung in den Oocyten von *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848). Diplomarbeit, Universität Gießen 1970.
- WEISBERGER, A.S.: Induction of altered globin synthesis in human immature erythrocytes incubated with ribonucleoprotein. *Proc. N.A.S.* 48, 68-80 (1962).
- WILCZOK, T.: Autoradiographic studies on the incorporation of heterologous DNA into the Novikoff hepatoma cells. *Neoplasma* 9, 369-379 (1962).
- WILCZOK, T.: Influence of molecular weight of deoxyribonucleic acid on its incorporation into neoplastic cells. *Nature* 196, 1314-1315 (1962).
- YOON, S. B., and A.S. FOX: Specific tests of the transformation by DNA of mutant to wild alleles and of wild to mutant alleles in *Drosophila*. *Genetics* 52, 485 (1965).

ZAMENHOF, S., H.E. ALEXANDER, and G. LEIDY: Studies on the chemistry of the transforming activity. I. Resistance to physical and chemical agents. J.Exp. Med. 98, 373-397 (1953).

ZANDER, C.D.: Künstliche Befruchtung bei lebendgebärenden Zahnkarpfen. Zool. Anz. 166, 81-87 (1961).

A N H A N G

Abkürzungen

Kulturmedien

Tabellen I bis V

Abbildungen 1-9

Abkürzungen

DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
RNase	Ribonuclease
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure-di-Natrium
BU	Bromuracil
JUdR	Joddesoxyuridin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Perchlorsäure
SSC	standardisierte Salz-Citrat-Lösung
TCA	Trichloressigsäure
H^3	Tritium
E	Extinktion
Ipm	Impulse pro Minute
Zpm	Zerfälle pro Minute

Kulturmedien

Citratmedium für E. coli 15T⁻

K_2HPO_4		30 g/l
Natriumcitrat . 5/2 H_2O		300 g/l
Glucose		200 g/l
Adenin und Guanin	je	100 mg/l
Asparagin		2 g/l
Alanin		4 g/l

Vitamine:

B_1 (Thiamin)	4 mg	
B_2 (Riboflavin)	4 mg	
Nicotinsäure	12 mg	
B_6 (Pyridoxol-HCl)	24 mg	pro 1 Liter
Natriumpanthothenat	8,5 mg	
Biotin	8 mg	

Salze:

$MgSO_4$. 7 H_2O	40 g	
NaCl	2 g	
Fe-citrat	2 g	pro 1 Liter
$MnSO_4$. 2 H_2O	1,5 g	

Für 1 l Medium werden

83,5 ml K_2HPO_4
83,5 ml Natriumcitrat
100,0 ml Glucose
50,0 ml Asparagin
50,0 ml Alanin
50,0 ml Vitamine
5,0 ml Salze
100,0 ml Adenin und Guanin
1,5 g Bacto-Casiton

mit aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und 20 Min. bei 100°C autoklaviert.

M9-Medium für S. typhimurium

10 x M9-Medium:

Na_2HPO_4	70 g	
KH_2PO_4	30 g	
NH_4Cl	10 g	pro 1 Liter
NaCl	5 g	

Für etwa 500 ml Medium werden folgende autoklavierte Komponenten
zusammengegeben:

450 ml	aquad dest.
50 ml	10 x M9-Medium
5 ml	0,01 M CaCl_2
5 ml	0,1 M MgSO_4
5 ml	40 % Glucose

Kulturmedium für die Embryonen(PBS)

Lösung I:

NaCl	7,2700 g	
KCl	0,1818 g	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,3110 g	pro 1 Liter
KH_2PO_4	0,1818 g	

Lösung II:

CaCl_2	0,073 g/100 ml
-----------------	----------------

Lösung III:

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,073 g/100 ml
--	----------------

Die Lösungen I, II und III werden im Verhältnis 8:1:1 gemischt und
steril-filtriert.

Tabelle I: Charakterisierung der Donor-DNA

	spez. Aktiv. in $\frac{\text{Zpm}}{\mu\text{g DNA}}$	$\frac{E_{250}}{E_{260}}$ $\frac{E_{280}}{E_{260}}$ $\frac{E_{290}}{E_{260}}$	molarer Extinktions- koeffizient	Phosphor- gehalt in %	Desoxy- ribose- gehalt in %	RNA-Verun- reinigung in %	Eiweißver- unreinigung in %
Theoretischer Wert für reine DNA	-	0,90 0,54- 0,26 0,55	6000-8000	9,9	36,1	-	-
H^3 -DNA aus E. coli	2×10^4	0,90 0,54 0,25	6200	9,5 ⁺	34,0 ⁺	5 ⁺	2 ⁺
H^3 -DNA aus S. typh.	5×10^4	0,90 0,54 0,25	6900	9,6 ⁺	34,0 ⁺	4 ⁺	2 ⁺
Kalbsthymus- DNA	-	0,89 0,53 0,23	7800	8,6 ⁺	31,5 ⁺	5 ⁺	10 ⁺

⁺ in % der nach UV-Absorptionsmessung in den Lösungen enthaltenen DNA-Menge

Tabelle II: Überlebensrate der Embryonen nach Kultur in PBS bzw. DNA-haltiger PBS und nach Injektion von PBS bzw. DNA-haltiger PBS in verschiedene Regionen.

		Überlebende Embryonen in %	
		nach 24 Stdn.	nach 48 Stdn.
Kultur in PBS (Kontrolle)		93	86
Kultur in DNA-haltiger PBS		96	96
Injektion von PBS (Kontrolle)	in den Raum um die Herzanlage	88	88
	in die Dorsalregion	100	88
	in den Dotter	90	90
Injektion von DNA-haltiger PBS	in den Raum um die Herzanlage	100	88
	in die Dorsalregion	92	72
	in den Dotter	100	90

Tabelle III: Radioaktivität in den Embryonen nach Kultur in PBS
und nach Kultur in H^3 -DNA-haltiger PBS.

	Radioaktivität in Ipm/Embryo	
	nach 10 Stdn.	nach 24 Stdn.
Kultur in PBS (Kontrolle)	20 ± 14	14 ± 8
Kultur in H^3 -DNA-haltiger PBS	19 ± 9	23 ± 15
Kultur in H^3 -DNA-haltiger PBS nach Entfernen der äußeren Hülle	69 ± 21	69 ± 21

Tabelle IV: Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion des mit bzw. ohne DNase oder RNase behandelten Homogenates von Embryonen, in die H^3 -DNA injiziert worden war.

	Radioaktivität in % der gesamten injizierten Radioaktivität							
	1 Std. nach der Injektion		40 Std. nach der Injektion		96 Std. nach der Injektion		140 Std. nach der Injektion	
	säureunlösliche Fraktion	säurelösliche Fraktion	säureunlösliche Fraktion	säurelösliche Fraktion	säureunlösliche Fraktion	säurelösliche Fraktion	säureunlösliche Fraktion	säurelösliche Fraktion
ohne DNase oder RNase-Behandlung (Kontrolle)	98,4 98,8 98,2	1,6 1,2 1,8	57,0 56,0 47,8	43,0 44,0 52,2	69,0 62,0 63,5	31,0 38,0 36,5	90,1 80,6 78,0	9,9 19,4 22,0
mit DNase-Behandlung	1,4 1,1 -	98,6 98,9 -	1,1 1,3 -	98,9 98,7 -	5,0 2,2 2,1	95,0 97,8 97,9	2,0 1,8 2,1	98,0 98,2 97,9
mit RNase-Behandlung	97,8 98,1 -	2,2 1,9 -	55,2 58,6 53,7	44,8 41,4 46,3	72,6 78,5 71,8	27,4 21,5 28,2	80,1 83,2 -	19,9 16,8 -

Tabelle V: Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion des mit bzw. ohne DNase oder RNase behandelten Homogenates von Embryonen, in die H^3 -Thymidin injiziert worden war.

	Radioaktivität in % der gesamten injizierten Radioaktivität			
	35 Stdn. nach der Injektion		90 Stdn. nach der Injektion	
	säureunlösliche Fraktion	säurelösliche Fraktion	säureunlösliche Fraktion	säurelösliche Fraktion
ohne DNase-oder RNase-Behandlung (Kontrolle)	84,4 83,5 86,0	15,6 16,5 14,0	91,5 95,5 -	8,5 4,5 -
mit DNase-Behandlung	1,3 1,1 1,1	98,7 98,9 98,9	2,3 1,3 1,1	97,7 98,7 98,9
mit RNase-Behandlung	83,2 82,6 86,5	16,8 17,4 13,5	90,2 89,6 88,5	9,8 10,4 11,5

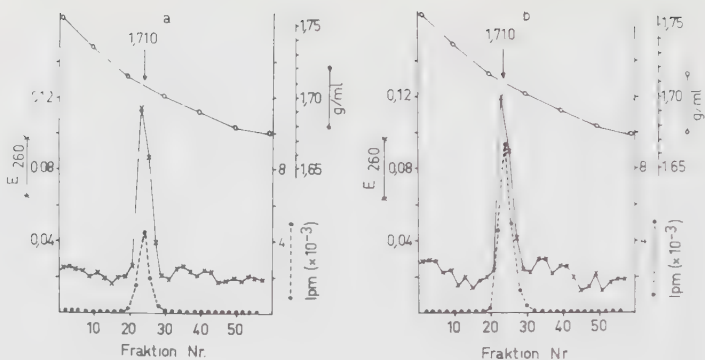


Abb. 1: Analyse von a) 20 μg H^3 -DNA aus *E. coli* und b) 20 μg H^3 -DNA aus *S. typhimurium* im CsCl -Dichtegradienten.

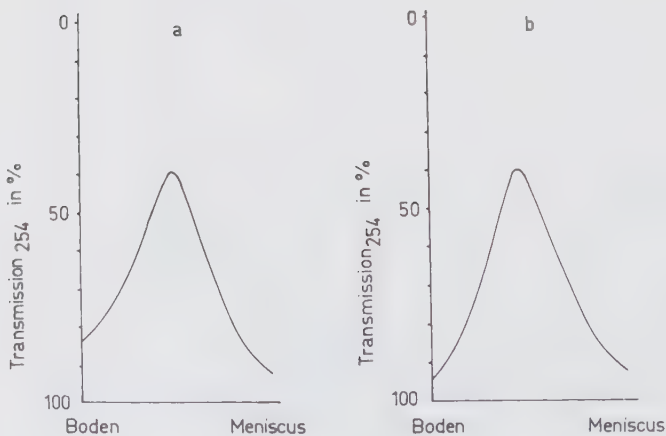


Abb. 2: Analyse von je 50 μg H^3 -DNA aus *S. typhimurium* a) einer unbehandelten Lösung und b) einer durch die Injektionskanüle gedrückten Lösung im linearen 5-20 % Sucrosegradienten.

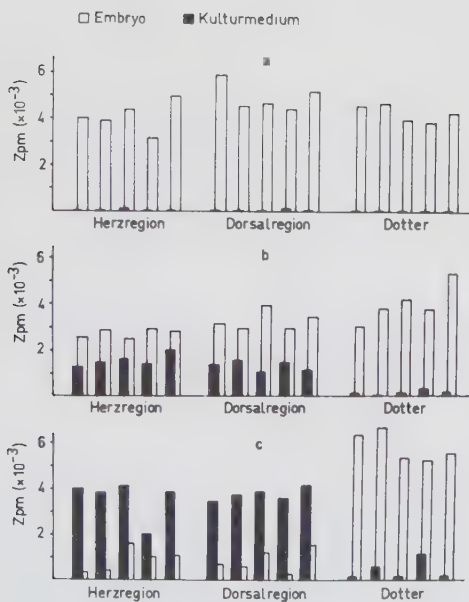


Abb. 3: Verbleib der Radioaktivität im Embryo nach Injektion von H^3 -DNA in den Raum um die Herzanlage, in die Dorsalregion oder in den Dotter unterhalb der Herzanlage.

a) 0 Min., b) 15 Min. und c) 120 Min. nach der Injektion. Entwicklungsstadien der Embryonen zum Zeitpunkt der Injektion: 9 und 10.

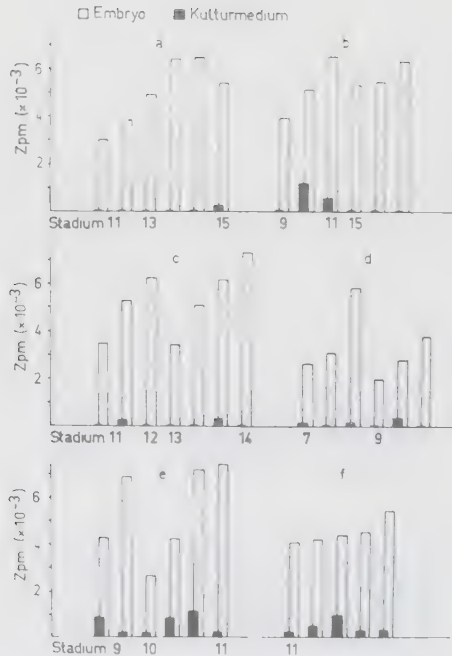


Abb. 4: Verbleib der Radioaktivität im Embryo nach Injektion von H^3 -DNA in den Dotter.

a) 0 Stdn., b) 2 Stdn., c) 20 Stdn., d) 95 Stdn., e) 200 Stdn. und f) 360 Stdn. nach der Injektion.

Entwicklungsstadien der Embryonen zum Zeitpunkt der Injektion: 7 bis 15.

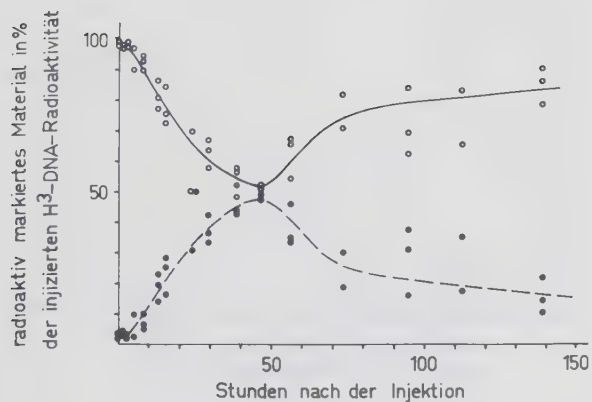


Abb. 5: Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen samt Dotter nach Injektion von H^3 -DNA.

- — — — — — säureunlösliches Material
- — — — — — säurelösliches Material

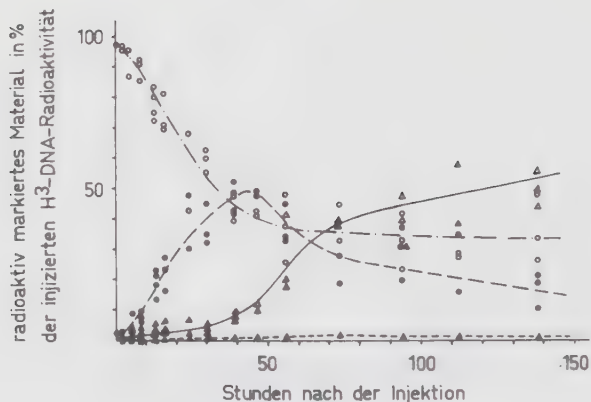


Abb. 6: Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen ohne Dotter sowie des abgetrennten Dotters nach Injektion von H^3 -DNA.

- △ ——— △ säureunlösliches Material im Embryo
- ▲ ——— ▲ säurelösliches Material im Embryo
- ——— ○ säureunlösliches Material im Dotter
- ——— ● säurelösliches Material im Dotter

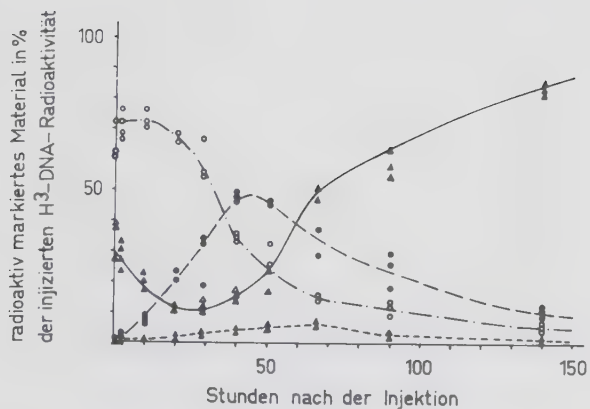


Abb. 7: Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Zellkerne sowie des Plasma-Dotter-Materials der Embryonen nach Injektion von H^3 -DNA.

- Δ — Δ säureunlösliches Material in den Zellkernen
- $\blacktriangle$ --- $\blacktriangle$ säurelösliches Material in den Zellkernen
- $\circ$ — $\circ$ säureunlösliches Material im Plasma-Dotter-Material
- $\bullet$ --- $\bullet$ säurelösliches Material im Plasma-Dotter-Material

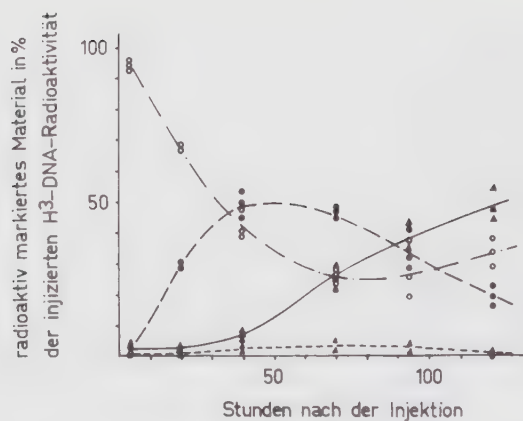


Abb. 8: Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen ohne Dotter sowie des abgetrennten Dotters nach Injektion von H^3 -DNA unter Zusatz von kaltem Thymidin.

- △——△ säureunlösliches Material im Embryo
- △-----△ säurelösliches Material im Embryo
- .-.-○ säureunlösliches Material im Dotter
- .-.-● säurelösliches Material im Dotter

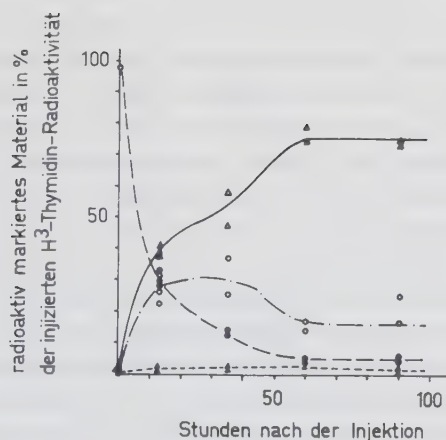


Abb. 9: Verteilung der Radioaktivität in der säureunlöslichen und säurelöslichen Fraktion der Embryonen ohne Dotter sowie des abgetrennten Dotters nach Injektion von H^3 -Thymidin.

- ▲—▲ säureunlösliches Material im Embryo
- ▲-----▲ säurelösliches Material im Embryo
- säureunlösliches Material im Dotter
- säurelösliches Material im Dotter

Diese Arbeit wurde im Genetischen Institut der Justus Liebig-Universität mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die Stiftung Volkswagenwerk durchgeführt. Den Angehörigen dieses Institutes, insbesondere Herrn Prof. Dr. W. Lueken, Fräulein Käthe Klinke, Fräulein cand.rer.nat. Erdmuthe von Grotthuss, Frau Dipl. Biol. Ursula Vielkind und Herrn R. Wutschka danke ich für tätige Hilfe und viele Ratschläge.

Dank für wertvolle Hilfe und Diskussion schulde ich ferner Herrn Prof. Dr. Ch. Scholtissek vom hiesigen Institut für Virologie, Herrn Prof. Dr. A. Eisenstark, Division of Biology, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA, Herrn Prof. Dr. A. Wacker, Institut für Therapeutische Chemie, Universität Frankfurt, sowie Herrn Prof. Dr. P. Hofschneider, Max-Planck-Institut für Biochemie, München.

Die Messungen am Flüssigkeits-Szintillationszähler erfolgten im Institut für Biophysik im Strahlencentrum der hiesigen Universität. Herrn Prof. Dr. A. Schraub und Herrn cand.rer.nat. H. Koch bin ich für die Einweisung in den Gebrauch dieses Gerätes sowie für die Hilfe bei der Auswertung der Zählergebnisse zu größtem Dank verpflichtet.

Schließlich möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. F. Anders, für die Anregung zu dieser Arbeit und sein stetes förderndes Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Lebenslauf

Am 12. August 1939 wurde ich in Komotau/Sudetenland als Sohn des Kaufmannes Robert Vielkind und dessen Ehefrau Ida, geb. Schmiedl, geboren. Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Grebenau Krs. Alsfeld und von 1951 bis 1960 das Albert Schweitzer-Gymnasium in Alsfeld, wo ich 1960 die Reifeprüfung im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig ablegte. Nach einjährigem Dienst bei der Bundeswehr begann ich im Sommersemester 1961 an der Justus Liebig-Universität Gießen mit dem Studium der Biologie. Von September 1964 bis Juli 1965 studierte ich an der Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA, und arbeitete als Research Assistent in den Laboratorien von A. Eisenstark, R.C. Consigli und K.G. Lark vorwiegend an molekulargenetischen Problemen an Bakterien, Phagen und Zellkulturen. Im Wintersemester 1965/66 setzte ich mein Studium an der Justus Liebig-Universität Gießen fort und begann im Sommersemester 1966 am Genetischen Institut meine Diplomarbeit, die im Wintersemester 1967/68 fertiggestellt wurde. Anschließend begann ich mit der vorliegenden Dissertation.

Während meiner Studienzeit war ich 4 Monate bei der Forschungsstelle Norderney mit biologisch-bodenkundlichen Untersuchungen des ostfriesischen Küstenwattes beschäftigt und nahm an einem mehrwöchigen Molekulargenetischen Kurs über Protein-Biosynthese am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen sowie an einem dreiwöchigen Kurs über Methoden der Bakteriengenetik im Institut für Genetik in Köln teil.

Seit dem 1. März 1969 bin ich mit der Verwaltung einer Assistentenstelle am Genetischen Institut beauftragt und habe seitdem regelmäßig Kurse im Rahmen der Unterrichtsveranstaltungen "Genetische Arbeitsmethoden" und "Genetisches Laboratorium" abgehalten.

Meine akademischen Lehrer waren u.a. die Herren Professoren F. Anders, W.E. Ankel, D.v. Denffer und R. Rott in Gießen sowie R.C. Consigli, A. Eisenstark und K.G. Lark in Manhattan, Kansas, USA.

Das ist eine sehr interessante Arbeit, die ich sehr gerne gelesen habe. Sie enthält viele wertvolle Informationen, die für die Forschung in diesem Bereich sehr hilfreich sein werden. Ich bin sehr dankbar für die Mühe, die Sie sich genommen haben, diese Arbeit zu verfassen. Ich hoffe, Sie werden viele weitere interessante Arbeiten veröffentlichen. Ich werde Ihre Arbeit weiter empfehlen und hoffe, dass sie vielen anderen Menschen nützlich sein wird. Ich bin sehr gespannt auf Ihre weiteren Arbeiten und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden.

Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr gespannt auf Ihre weiteren Arbeiten und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr gespannt auf Ihre weiteren Arbeiten und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr gespannt auf Ihre weiteren Arbeiten und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr gespannt auf Ihre weiteren Arbeiten und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden.

Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr gespannt auf Ihre weiteren Arbeiten und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr gespannt auf Ihre weiteren Arbeiten und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr gespannt auf Ihre weiteren Arbeiten und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr dankbar für Ihre Unterstützung und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden. Ich bin sehr gespannt auf Ihre weiteren Arbeiten und hoffe, dass Sie bald wieder etwas Neues für die Forschung beisteuern werden.

